

**Strukturbestimmung des humanen Guanylin-Prohormons zur
Analyse der Rolle einer Hormon-Prosequenz
und
Design eines löslichen Fragments der extrazellulären Domäne
der Guanylatzyklase-C**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät Biologie, Chemie und Geowissenschaften
der Universität Bayreuth

vorgelegt von

Diplom-Biochemiker

Thomas Lauber

Bayreuth 2003

Die vorliegende Arbeit wurde von September 2000 bis Juli 2003 am Lehrstuhl für Struktur und Chemie der Biopolymere unter Leitung von PD Dr. Ute C. Marx angefertigt.

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften der Universität Bayreuth genehmigten Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

Promotionsgesuch eingereicht am: 09.07.2003

Tag des wissenschaftlichen Kolloquiums: 07.11.2003

Erster Gutachter: PD Dr. Ute C. Marx

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Franz X. Schmid

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Das (Uro)Guanylin/Guanylatzyklase-C System und bakteriell verursachte sekretorische Diarrhöen.....	1
1.2 Die hitzestabilen Enterotoxine aus <i>E. coli</i>	2
1.3 Die Peptidhormone Guanylin und Uroguanylin.....	3
1.3.1 Entdeckung und physiologische Funktion der endogenen GC-C-Liganden.....	3
1.3.2 Topologische Isomerie und Struktur von Guanylin und Uroguanylin.....	4
1.4 Die Guanylin/Uroguanylin/STa-vermittelte Signaltransduktion.....	7
1.5 Die Prohormone von Guanylin und Uroguanylin.....	9
1.5.1 Identifizierung und Aktivität.....	9
1.5.2 Die Funktion der Prosequenz bei der oxidativen Faltung.....	10
1.5.3 Der Oligomerzustand der Guanylin- und Uroguanylin-Prohormone.....	10
1.5.4 Ist die topologische Isomerie bereits in den Prohormonen realisiert?.....	11
1.6 Die Guanylatzyklase-C.....	11
1.6.1 Der Oligomerzustand der Guanylatzyklase-C.....	13
1.6.2 Die COOH-terminale Domäne.....	14
1.6.3 Die katalytische Guanylatzyklase-Domäne.....	14
1.6.4 Die Kinase-homologe Domäne.....	14
1.6.5 Die extrazelluläre Ligandenbindungsdomäne der Guanylatzyklase-C.....	15
2. Ziele.....	16
3. Materialien.....	18
3.1 Bakterienstämme.....	18
3.1.1 <i>E. coli</i> Top10.....	18
3.1.2 <i>E. coli</i> AD494(DE3) und Origami(DE3).....	19
3.2 Plasmide.....	19
3.2.1 pBlueskript II KS.....	20
3.2.2 pET-32a.....	21
3.2.3 pET-32a- <i>proguanylin</i> -Derivate.....	22
3.2.4 pET-32a- <i>miniGC-C</i>	22
3.2.5 pGEM-T.....	23
3.3 Oligonukleotide.....	23
3.4 Nährmedien.....	25
3.5 Enzyme, Proteine, Standards und Chemikalien.....	26
3.6 Sonstige Materialien.....	27
4. Methoden.....	28
4.1 Bestimmung der Bakteriendichte.....	28
4.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen.....	28
4.3 Elektrophoretische Verfahren.....	28
4.3.1 Agarosegelelektrophorese.....	28
4.3.2 SDS-Gelelektrophorese.....	29
4.3.3 Kapillarzonenlektrophorese.....	30
4.4 Zentrifugationen.....	31
4.5 Isolierung von Plasmid-DNA.....	31
4.6 Fällung und Reinigung von DNA.....	31
4.6.1 Butanolpräzipitation.....	31
4.6.2 Reinigung über Silikagelmembranen.....	32

4.6.3 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	32
4.7 Enzymatische Behandlung von DNA.....	32
4.7.1 Restriktion.....	32
4.7.2 Dephosphorylierung von 5'-Enden.....	32
4.7.3 Ligation.....	33
4.7.4 Sequenzierung.....	33
4.8 Anwendungen der Polymerase-Kettenreaktion.....	33
4.8.1 Kolonie-PCR.....	33
4.8.2 PCR mit Linker-Primern.....	34
4.8.3 <i>splicing-by-overlap-extension</i> -PCR-Mutagenese.....	34
4.8.4 <i>QuickChange</i> -PCR-Mutagenese.....	36
4.9 Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA.....	37
4.9.1 CaCl ₂ -Transformation.....	37
4.9.2 Elektrottransformation.....	38
4.10 Anzucht von Bakterien.....	38
4.11 Expression von Fusionsproteinen.....	39
4.11.1 Untersuchung auf Überexpression.....	39
4.11.2 Schüttelkulturen.....	39
4.12 Reinigung von Fusionsproteinen.....	40
4.12.1 Gewinnung zellfreier Extrakte.....	40
4.12.2 Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie.....	40
4.13 Entfernen des Fusionspartners.....	41
4.13.1 Behandlung der Fusionsproteine mit Proteinasen.....	41
4.13.2 Isolierung des Proteins ohne Fusionspartner.....	42
4.13.3 <i>Reversed-phase high performance liquid chromatography</i> (RP-HPLC).....	43
4.14 Nachweis der Disulfidverbrückung von Proguanylin.....	44
4.15 Nachweis der biologischen Aktivität.....	44
4.16 Massenspektrometrie.....	45
4.17 Analytische Ultrazentrifugation.....	45
4.17.1 Theoretische Grundlagen.....	45
4.17.2 Experimentelle Durchführung.....	53
4.18 CD-Spektroskopie.....	55
4.18.1 Probenvorbereitung.....	55
4.18.2 Gerät und Meßbedingungen.....	56
4.19 NMR Spektroskopie.....	57
4.19.1 Probenvorbereitung.....	57
4.19.2 Allgemeines.....	57
4.19.3 NMR-Experimente zur Strukturbestimmung von Proguanylin.....	58
4.19.4 Experimente zur sequentiellen Zuordnung von Proguanylin-C86S/C94S.....	62
4.19.5 Experimente mit ¹⁵ N Proguanylin-Δ(28-37) und ¹⁵ N Proguanylin-C48S/C61S.....	63
4.19.6 Prozessierung der NMR Spektren.....	63
4.19.7 Sequentielle Zuordnung.....	64
4.19.8 Sekundäre chemische Verschiebung.....	65
4.19.9 Analyse sekundärstrukturbestimmender NOEs.....	66
4.20 Berechnung der dreidimensionalen Struktur von Proguanylin.....	66
4.20.1 Computer Hard- und Software.....	66
4.20.2 Experimentelle Daten.....	67
4.20.3 Berechnung der Strukturen nach dem Prinzip des <i>simulated annealing</i>	69
4.20.4 Verfeinerung der Strukturen mit dipolaren Kopplungen.....	71
4.21 Komparative Molekülmodellierung.....	72

5. Experimente und Ergebnisse.....	73
5.1 Das humane Prohormon Proguanylin.....	73
5.1.1 Klonierungen.....	73
5.1.1.1 pET-32a-EK- <i>proguanylin</i> und pET-32a-Xa- <i>proguanylin</i>	73
5.1.1.2 pET-32a-pres- <i>proguanylin</i> und pET-32a-Asp-pres- <i>proguanylin</i>	74
5.1.2 Expression in <i>E. coli</i> AD494(DE3).....	75
5.1.3 Reinigung von rekombinantem Proguanylin.....	76
5.1.3.1 Zellaufschluß.....	76
5.1.3.2 Reinigung der Fusionsproteine.....	77
5.1.3.3 Behandlung der Fusionsproteine mit Proteinasen.....	78
5.1.3.4 Isolierung von Proguanylin ohne Fusionspartner.....	79
5.1.3.5 Isotopenmarkierung.....	81
5.1.4 Charakterisierung von Proguanylin.....	82
5.1.4.1 Massenspektrometrie.....	82
5.1.4.2 Kapillarzonenoelektrophorese und RP-HPLC.....	82
5.1.4.3 Nachweis der nativen Disulfidverbrückung.....	84
5.1.4.4 Nachweis der biologischen Aktivität.....	85
5.1.4.5 CD-Spektroskopie.....	86
5.1.4.6 1D- ¹ H-NMR Spektroskopie.....	88
5.1.4.7 Analytische Ultrazentrifugation zur Untersuchung des Assoziationsgrades.....	90
5.1.5 Strukturbestimmung von Proguanylin in Lösung.....	96
5.1.5.1 Sequenzspezifische Zuordnung der Resonanzen.....	96
5.1.5.2 Die Prolinkonformation.....	99
5.1.5.3 Hinweise auf die Topologie von Guanylin.....	99
5.1.5.4 Information über die sequenzspezifische Sekundärstruktur.....	100
5.1.5.5 Messung des heteronuklearen { ¹ H} ¹⁵ N NOE.....	104
5.1.5.6 Strukturberechnung auf Basis der NMR-Daten.....	105
5.1.5.7 Die Struktur von Proguanylin in Lösung.....	110
5.2 Mutationsstudien an Proguanylin.....	112
5.2.1 Klonierungen.....	112
5.2.1.1 Proguanylin-Δ(28-37) und Proguanylin-C48S/C61S.....	112
5.2.1.2 Proguanylin-C86S/C94S.....	113
5.2.2 Expression und Reinigung.....	113
5.2.2.1 Massenspektrometrie.....	114
5.2.3 Proguanylin-Δ(28-37).....	115
5.2.3.1 Analytische Ultrazentrifugation zur Untersuchung des Assoziations- grades.....	116
5.2.3.2 CD-Spektroskopie.....	119
5.2.3.3 NMR-spektroskopische Untersuchungen.....	121
5.2.4 Proguanylin-C48S/C61S.....	123
5.2.4.1 Spektroskopische Untersuchungen.....	123
5.2.4.2 Analyse der Disulfidverbrückung.....	125
5.2.5 Proguanylin-C86S/C94S.....	127
5.2.5.1 CD-Spektroskopie.....	127
5.2.5.2 NMR-spektroskopische Untersuchungen an Proguanylin-C86S/C94S.....	128
5.3 Die extrazelluläre Domäne der Guanylatzyklase-C.....	132
5.3.1 Komparative Molekülmodellierung der GC-C _{ECD}	133
5.3.2 Design eines löslichen Rezeptorfragments (miniGC-C).....	136
5.3.2.1 Molekülmodellierung von miniGC-C.....	136
5.3.2.2 Klonierung von miniGC-C.....	138
5.3.2.3 Expression von miniGC-C.....	139

5.3.2.4 Bindung des hitzestabilen Enterotoxins STp an miniGC-C.....	141
6. Diskussion.....	142
6.1 Das humane Prohormon Proguanylin.....	142
6.1.1 Expression und Reinigung.....	142
6.1.1.1 Behandlung der Fusionsproteine mit Proteinasen.....	143
6.1.1.2 Abhängigkeit der Löslichkeit der Fusionsproteine von der Polarität der Proteinase-Erkennungssequenz.....	143
6.1.2 Charakterisierung von rekombinantem Proguanylin.....	144
6.1.2.1 CD-spektroskopische Untersuchungen.....	145
6.1.2.2 Analytische Ultrazentrifugation.....	147
6.1.3 Analyse der Struktur von Proguanylin in Lösung.....	149
6.1.3.1 Relevanz der NH ₂ -terminalen Aminosäuren für die oxidative Faltung.....	149
6.1.3.2 Die Bedeutung der Disulfidbrücke Cys48 – Cys61.....	150
6.1.3.3 Stabilisierung der Guanylin A-Form durch die Prosequenz.....	151
6.1.3.4 Mögliche Ursachen für die fehlende biologische Aktivität von Proguanylin.....	153
6.1.3.5 Analyse möglicher Proteinase-Erkennungsstellen für die Prozessierung von Proguanylin.....	156
6.1.3.6 Die Proguanylin-Struktur stellt einen neuen Proteinfaltungstyp dar.....	157
6.1.3.7 Für das verwandte Uroguanylin-Prohormon kann eine Proguanylin- homologe Faltung angenommen werden.....	157
6.2 Die extrazelluläre Domäne der Guanylatzyklase-C.....	159
6.2.1 Die Strukturmodelle von miniGC-C und GC-C _{ECD}	159
6.2.2 Die Guanylin/GC-C-Wechselwirkung.....	159
6.2.3 Die Aktivierung der GC-C.....	161
7. Zusammenfassung.....	163
8. Summary.....	165
9. Abkürzungsverzeichnis.....	167
10. Literaturverzeichnis.....	170
10.1 Allgemeines Literaturverzeichnis.....	170
10.2 Eigene Publikationen.....	186
11. Anhang.....	187
11.1 Nukleotidsequenzen.....	187
11.1.1 Nukleotidsequenz von pBlueKS- <i>miniGC-C</i>	187
11.1.2 Nukleotidsequenz von pET-32a-EK- <i>proguanylin</i>	189
11.1.3 Nukleotidsequenz von pGEM-T-Xa- <i>proguanylin</i>	190
11.1.4 Nukleotidsequenz von pET-32a-pres- <i>proguanylin</i>	191
11.1.5 Nukleotidsequenz von pET-32a-Asp-pres- <i>proguanylin</i>	192
11.1.6 Nukleotidsequenz von pET-32a-pres- <i>proguanylin</i> -Δ(28-37).....	193
11.1.7 Nukleotidsequenz von pET-32a-pres- <i>proguanylin-c48s/c61s</i>	194
11.1.8 Nukleotidsequenz von pET-32a-pres- <i>proguanylin-c86s/c94s</i>	195
11.2 XPLOR-Protokolle.....	196
11.2.1 progua_psf.inp: Protokoll zum Erstellen der Strukturdatei progua.psf.....	196
11.2.2 srg3grid_55_40_.inp: grid search Protokoll zur Bestimmung der Tensorkomponenten.....	196
11.2.3 nih3GRID_55_40_final.inp: Protokoll zur Verfeinerung der Strukturen mittels residualen dipolaren Kopplungen.....	201

11.3 Chemische Verschiebungen für Proguanylin (BMRB 5603).....	208
11.4 Chemische Verschiebungen für Proguanylin-C86S/C94S.....	215
11.5 Experimentelle Randbedingungen für die Berechnung der Proguanylin-Struktur.....	219
11.5.1 $^3J(\text{HN}, \text{H}\alpha)$ -Kopplungskonstanten.....	219
11.5.2 Beschränkungen durch Wasserstoffbrücken.....	220
11.5.3 Beschränkungen durch residuale dipolare Kopplungen.....	221
12. Danksagung.....	227
13. Erklärung.....	228

1. Einleitung

1.1 Das (Uro)Guanylin/Guanylatzyklase-C System und bakteriell verursachte sekretorische Diarrhöen

Die Peptidhormone Guanylin und Uroguanylin sind über die Aktivierung eines intestinalen Rezeptors, der Guanylatzyklase-C (GC-C), wesentlich an der Regulation des Flüssigkeits- und Elektrolythaushaltes sowie der Nährstoffaufnahme im Darm beteiligt (Hess *et al.*, 1995; Forte *et al.*, 2000). Die physiologische Bedeutung dieser Peptidhormone wird jedoch vor allem durch den Zusammenhang zu bakteriell verursachten, schweren sekretorischen Diarrhöen hervorgehoben, die noch immer eine der häufigsten Ursachen für die Kindersterblichkeit in der Dritten Welt darstellen (Giannella, 1981; Field & Semrad, 1993; WHO Facts Sheet, 1996). Eine Hauptursache für diese Erkrankungen stellen unter unhygienischen Bedingungen aufgenommene Keime oder Viren dar, die durch ihre Wirkung im Darm eine Vielzahl von pathologischen Effekten auf den Menschen ausüben. Dabei zählen zu den aufgenommenen Keimen auch pathogene Varianten der in der Darmflora des Menschen angesiedelten Spezies *Escherichia coli*. Die die starken wässrigen Durchfälle auslösenden Faktoren sind von den Bakterienstämmen produzierte Enterotoxine, die bei *E. coli* in hitzelabile und hitzestabile Enterotoxine eingeteilt werden. Die hitzelabilen Enterotoxine sind homolog zum Cholera toxin und führen über eine analoge Wirkung zu einem intrazellulären Anstieg der cAMP-Konzentration, der schließlich einen verstärkten Ausstrom von Na⁺ und Wasser in das Darmlumen nach sich zieht (Sixma *et al.*, 1992). Im Gegensatz dazu ahmen die hitzestabilen Enterotoxine die dreidimensionalen Strukturen der intestinalen Peptidhormone Guanylin und Uroguanylin nach (Ozaki *et al.*, 1991; Skelton *et al.*, 1994; Marx *et al.*, 1998) und lösen durch spezifische und verstärkte Aktivierung der GC-C einen intrazellulären Konzentrationsanstieg von cGMP aus (Schulz *et al.*, 1990). Dieser führt neben einer erhöhten Chlorid-Sekretion gleichzeitig zur Hemmung der NaCl-Resorption und über einen die Chlorid-Sekretion begleitenden passiven Ausstrom von Wasser in das Darmlumen zu den beobachteten schweren wässrigen Durchfällen (Chu & Walker, 1993; Forte, 1999).

Die Rolle des (Uro)Guanylin/Guanylatzyklase-C Systems bei der Enterotoxin-vermittelten Diarrhöe ist bereits seit längerem bekannt (Giannella, 1981; Field & Semrad, 1993; Forte, 1999), und das pharmakologische Potential dieser Peptidhormone ist offensichtlich. Dennoch

gibt es bis heute nur sehr wenige Informationen über molekulare und strukturelle Details der Vorläuferproteine der GC-C-Liganden sowie der Ligandenbindungsdomäne dieses Rezeptors, und grundlegende Fragen zum Verständnis der spezifischen Erkennung und Aktivierung der GC-C sind noch immer ungeklärt.

1.2 Die hitzestabilen Enterotoxine aus *E. coli*

Die von manchen *E. coli* Stämmen gebildeten hitzestabilen Enterotoxine (STa) sind kleine cysteinreiche Peptide, die bereits vor Identifizierung der GC-C als Rezeptor für STa bekannt waren. Diese Toxine zeichnen sich durch eine hohe Sequenzidentität und ein konserviertes, für die Aktivität essentielles Disulfidverbrückungsmuster aus (Abb. 1.1; Yoshimura *et al.*, 1985; Garipey *et al.*, 1987; Shimonishi *et al.*, 1987). Die in einem Sequenzabschnitt von nur 13 Aminosäuren enthaltenen sechs Cysteinreste sind dabei in einer 1-4/2-5/3-6 Anordnung verknüpft (Abb. 1.1; Shimonishi *et al.*, 1987) und bewirken die äußerst stabile dreidimensionale Struktur und Hitze- sowie pH-Stabilität von STa (Shimonishi *et al.*, 1987; Ozaki *et al.*, 1991).



Abbildung 1.1: Sequenzvergleich der von *E. coli* gebildeten hitzestabilen Enterotoxine des STa-Typs. Die Bezeichnung erfolgt nach dem jeweiligen Wirtsorganismus (h: Mensch; p: Schwein). Identische Aminosäuren sind schwarz unterlegt, die für die biologische Aktivität wichtigen Disulfidbrücken sind dargestellt.

Anhand der chemischen Synthese von STa-Analoga mit nur zwei Disulfidbrücken, die alle eine geringere Aktivität als die wildtypische Variante aufweisen, konnte gezeigt werden, daß den einzelnen Disulfidbrücken eine unterschiedliche Relevanz für die Rezeptorbindung und -aktivierung zukommt. Demnach ist die Verbindung des zweiten und fünften Cysteinrestes essentiell, während eine der beiden anderen als weitere Brücke für die Rezeptoraktivierung ausreichend ist (Garipey *et al.*, 1987). Neben der Bedeutung der Disulfidbrücken wurde auch die Relevanz der übrigen Aminosäuren für die Toxizität der Peptide durch systematische Austausche untersucht. Als wichtigste Positionen wurden dabei der Asparagin- und Alaninrest im mittleren Sequenzabschnitt identifiziert, sowie der Glutamat- und Leucinrest (Carpick & Garipey, 1991). Alle übrigen von Cystein verschiedenen Positionen waren eher tolerant

gegenüber den eingeführten Veränderungen.

1.3 Die Peptidhormone Guanylin und Uroguanylin

1.3.1 Entdeckung und physiologische Funktion der endogenen GC-C-Liganden

Erst die gezielte Suche führte zur Identifizierung von endogenen Liganden der GC-C. Dabei wurde zunächst ein 15 Aminosäurereste umfassendes Peptid aus Dünndarmextrakten von Ratten isoliert, das aufgrund seiner GC-C-aktivierenden Eigenschaften mit Guanylin bezeichnet wurde (Currie *et al.*, 1992). Nur kurze Zeit später wurde ein weiterer endogener Ligand aus dem Urin von Opossum isoliert und der Herkunft entsprechend Uroguanylin benannt (Hamra *et al.*, 1993). Beide Peptidhormone weisen eine Sequenzidentität von 42 % (Guanylin) bzw. 57 % (Uroguanylin) zum hitzestabilen Enterotoxin aus *E. coli* auf, besitzen jedoch nur zwei, in einer 1-3/2-4 Anordnung verknüpfte Disulfidbrücken (Abb. 1.2). Diese entsprechen den Disulfidbrücken 2-5/3-6 von STa (Abb. 1.2) und sind ebenfalls für die Aktivität beider Peptidhormone essentiell (Currie *et al.*, 1992; Klodt *et al.*, 1997).

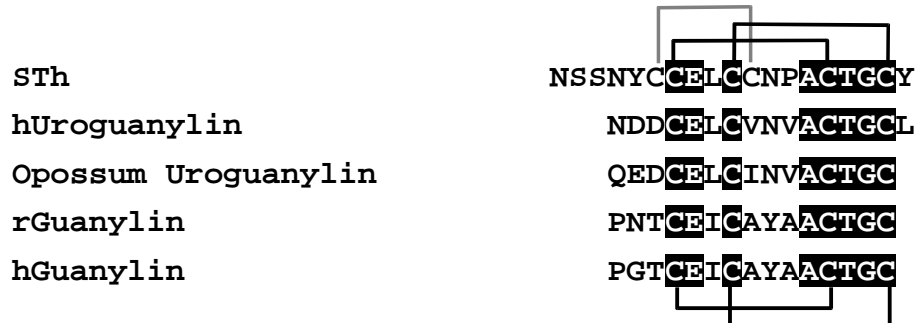


Abbildung 1.2: Sequenzvergleich des hitzestabilen Enterotoxins STh mit den Guanylinen aus Mensch und Ratte, sowie humanem und Opossum Uroguanylin. Identische Aminosäuren sind schwarz unterlegt, die für die biologische Aktivität essentiellen Disulfidbrücken sind in schwarz, die zusätzliche Disulfidbrücke von STh ist in grau dargestellt.

Wie bereits erwähnt, aktivieren sowohl Guanylin als auch Uroguanylin und STa den gleichen Rezeptor, die GC-C. Dabei konnte neben der konzentrationsabhängigen Wirkung von Guanylin und Uroguanylin durch Konkurrenzexperimente gezeigt werden, daß beide Peptidhormone mit STa um die gleiche Bindungsstelle auf der GC-C konkurrieren (Currie *et al.*, 1992, Hamra *et al.*, 1993). Die toxische Wirkung der gegenüber den endogenen Liganden etwa 100-fach aktiveren Enterotoxine kann unter anderem auf die gegenüber Guanylin und

Uroguanylin zusätzliche dritte Disulfidbrücke zurückgeführt werden (Gariépy *et al.*, 1987; Forte, 1999). Die Bindungs- und Aktivierungsfähigkeit nimmt dabei von STa über Uroguanylin zu Guanylin hin ab (Forte, 1999).

Da Guanylin und Uroguanylin durch enteroendokrine Zellen in das Blut und das Darmlumen sezerniert werden, wurde eine regulatorische Funktion in der Magen- und Dünndarmsekretion angenommen (de Sauvage *et al.*, 1992; Hess *et al.*, 1995; Forte *et al.*, 2000). Dabei zeigen beide Hormone eine pH-abhängige Aktivität, wobei Guanylin bei einem alkalischen pH-Wert aktiver und Uroguanylin bei saurem pH-Wert aktiver ist (Hamra *et al.*, 1997; Joo *et al.*, 1998). Diese pH-Abhängigkeit steht im Einklang mit dem komplementären Expressionsmuster von Guanylin und Uroguanylin im Gastrointestinaltrakt. Während Guanylin vom Duodenum bis hin zum Kolon in zunehmendem Maß, sowie in geringer Menge in Niere, Nebenniere, Uterus und Ovidukt von Ratten exprimiert wird (Schulz *et al.*, 1992; Wiegand *et al.*, 1992), kommt Uroguanylin im gesamten Gastrointestinaltrakt, einschließlich des Magens und in geringen Mengen in Niere, Leber, Pankreas, Herz und Lunge vor (Miyazato *et al.*, 1996a; Miyazato *et al.*, 1996b; Fan *et al.*, 1997).

Aufgrund der Expression in Geweben außerhalb des Gastrointestinaltraktes und deren Zirkulation im Plasma, wurde neben der bereits erwähnten Regulation des Flüssigkeitshaushaltes im Darm eine weitere endokrine Funktion vermutet. Als eine derartige Funktion wurde eine bislang unbekannte endokrine, den Magen-Darm-Trakt und die Niere verknüpfende Achse zur Regulation der renalen Salz- und Wasserausscheidung nach oraler Salzaufnahme postuliert (Forte *et al.*, 2000). Diese Annahme beruht auf der Beobachtung einer Guanylin- bzw. Uroguanylin-induzierten erhöhten Natriurese und Kaliurese *in vivo* und *in vitro* (Fonteles *et al.*, 1998; Carrithers *et al.*, 1999; Forte *et al.*, 2000).

1.3.2 Topologische Isomerie und Struktur von Guanylin und Uroguanylin

Für die biologische Aktivität der Peptidhormone Guanylin und Uroguanylin sind zwei Disulfidbrücken mit einer 1-3/2-4 Anordnung essentiell (Kapitel 1.3.1). Bei der Strukturbestimmung eines 13 Aminosäuren umfassenden synthetischen Guanylins mittels NMR Spektroskopie waren trotz einer einheitlichen Disulfidverbrückung zwei unterschiedliche Hormonkonformationen aufgefallen (Skelton *et al.*, 1994). In den NMR-Spektren konnten diese beiden als topologische Guanylin-Isomere bezeichneten Konformationen anhand diskreter Spinsystemsätze mit jeweils charakteristischen chemischen Verschiebungen

voneinander unterschieden werden. Die Strukturen der beiden Isomere wurden als A- und B-Form bezeichnet und lassen sich durch eine aus drei Schleifen bestehende, rechtshändige Spirale (A-Form), bzw. durch eine linkshändige Spirale (B-Form) beschreiben (Abb. 1.3, (a); Skelton *et al.*, 1994). Eine einfachere Unterscheidung beider Isomere kann anhand der relativen Orientierung der die zentralen Cysteinreste verbindenden Schleife bezüglich der durch die Disulfidbrücken aufgespannten Ebene erfolgen (Abb. 1.3, (b)).

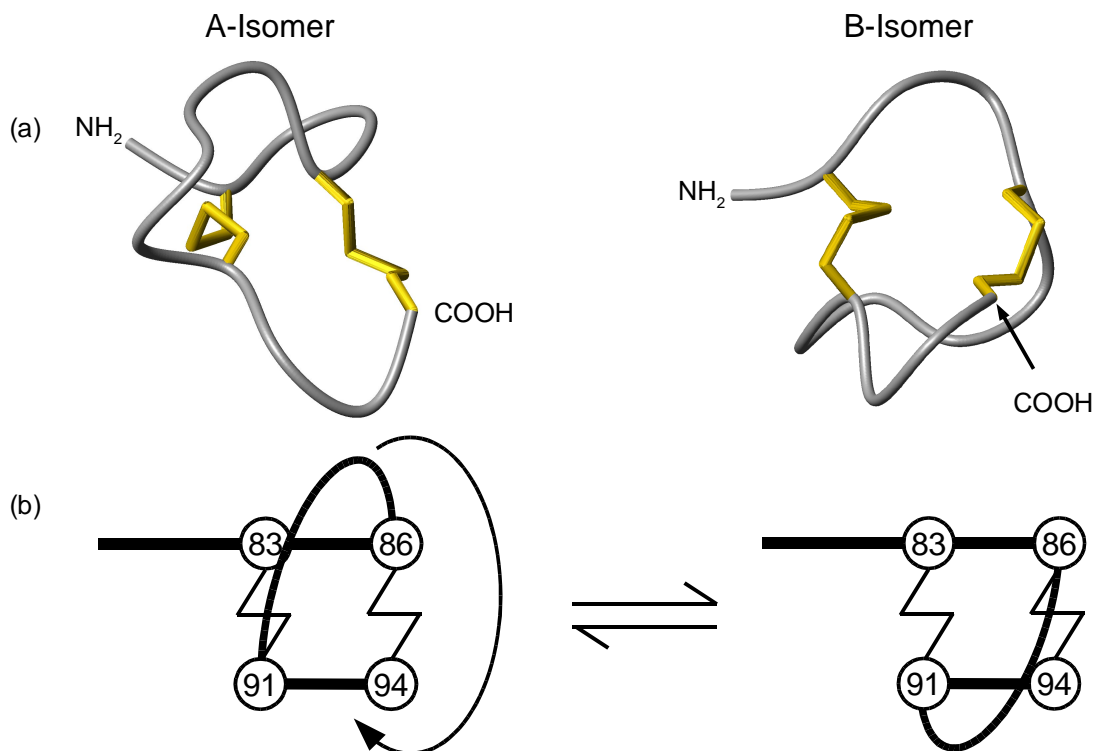


Abbildung 1.3: (a) Schematische Darstellung der Strukturen der Guanylin A- und B-Isomere (nach: Skelton *et al.*, 1994; PDB Einträge 1gna und 1gnb). Die für die biologische Aktivität essentiellen Disulfidbrücken (entsprechend Cys83 – Cys86; Cys91 – Cys94 von Proguanylin) sind in gelb dargestellt. Die Abbildung wurde mit dem Programm MolMol (Koradi *et al.*, 1996) erstellt. (b) Vereinfachte Darstellung der topologischen Isomere. Im A-Isomer befindet sich die zentrale Schleife oberhalb und im B-Isomer unterhalb der durch die Disulfidbrücken aufgespannten Ebene. Bei der Umwandlung der beiden Isomere schwingt die zentrale topologiebestimmende Schleife um den COOH-Terminus (durch einen Pfeil angedeutet; nach: Marx *et al.*, 1998; Schulz, 2000; Marx *et al.*, 2001). Die Disulfidbrücken sind als gezackte Linie und die Cysteinreste als Kreise dargestellt. Die Nummern entsprechen der jeweiligen Sequenzposition im Prohormon.

Diese deutlich unterschiedlichen Strukturen der Guanylin-Isomere legten auch Differenzen bei den biologischen Aktivitäten nahe. Ein erster Hinweis auf das Vorliegen von nur einer einzigen aktiven Konformation wurde aus dem Vergleich der beiden Strukturen mit der Kristallstruktur von STp-(5-17) erhalten, dem zufolge die A-Form als das biologisch aktive

Isomer plausibel erschien (Abb. 1.4; Skelton *et al.*, 1994).

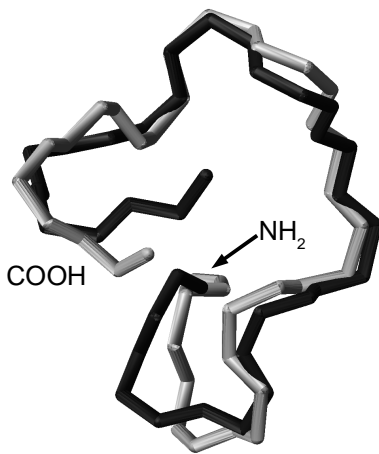


Abbildung 1.4: Vergleich der Struktur des humanen Guanylin A-Isomers (grau) mit der Kristallstruktur des hitzestabilen Enterotoxins STp-(5-17) aus *E. coli* (schwarz). Dargestellt sind die Rückgratverläufe beider Peptide. Der RMSD-Wert für die schweren Rückgrat-atome beider Peptide beträgt 1,4 Å. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde auf die Darstellung der Disulfidbrücken verzichtet (nach: Ozaki *et al.*, 1991; Skelton *et al.*, 1994; PDB Einträge 1gna (Guanylin) und 1etn (STp-(5-17))). Die Abbildung wurde mit dem Programm MolMol (Koradi *et al.*, 1996) erstellt.

Eine fundierte experimentelle Basis für diese Vermutung war jedoch nicht gegeben, da beide Isomere im Gleichgewicht vorliegen und nicht dauerhaft voneinander getrennt werden können. Durch NMR-spektroskopische und RP-HPLC-Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß die Dauer der Umwandlung innerhalb von Sekunden bis hin zu etwa 90 min stattfindet (Klodt *et al.*, 1997). Für Uroguanylin, das im Vergleich mit Guanylin am COOH-Terminus einen zusätzlichen Leucinrest besitzt (Abb. 1.2), ist die Umwandlungsgeschwindigkeit der analog auftretenden Isomere mit Guanylin-ähnlicher Struktur deutlich langsamer (Marx *et al.*, 1998). Aus dieser Beobachtung konnte schließlich durch COOH-terminale Verlängerung der Guanylin-Sequenz eine dauerhafte Trennung und somit eine separate Untersuchung der biologischen Aktivitäten der Guanylin-Isomere erreicht werden (Schulz *et al.*, 1998). Diese Experimente belegten eindeutig die aus dem Vergleich der Strukturen abgeleitete Annahme eines aktiven A- und inaktiven B-Isomers.

Als Mechanismus für die Umwandlung der beiden Isomere wurden mehrere Möglichkeiten, wie zum Beispiel eine kurzzeitige Öffnung der Disulfidbrücken oder ein Durchschwingen der topologiebestimmenden zentralen Schleife durch die von den Disulfidbrücken gebildete Ebene vorgeschlagen (Skelton *et al.*, 1994). Da diese Annahmen nicht bestätigt werden konnten und ein unmittelbarer Einfluß der COOH-terminalen Verlängerung der Guanylin-Sequenz auf die Umwandlungskinetik der Isomere beobachtet wurde (s.o.; Schulz *et al.*, 1998), geht man davon aus, daß die zentrale Schleife um den COOH-Terminus herum schwingen muß (Schulz, 2000; Marx *et al.*, 2001). Diese Annahme wurde für Uroguanylin durch systematische Austausche von Aminosäuren und Untersuchung der veränderten Peptide bestätigt (Schulz, 2000).

Die Analyse der Aktivität der jeweiligen Uroguanylin- bzw. Guanylin-Derivate ermöglichte gleichzeitig eine Bestimmung funktionell wichtiger Reste. Als diese wurden der zentrale Asparagin- (Uroguanylin), bzw. Tyrosinrest (Guanylin) sowie der Leucin- (Uroguanylin), bzw. Isoleucinrest (Guanylin) identifiziert (Schulz, 2000), die den bereits im STa als funktionell wichtig identifizierten Sequenzpositionen entsprechen (Kapitel 1.2; Carpick & Garipey, 1991).

1.4 Die Guanylin/Uroguanylin/STa-vermittelte Signaltransduktion

Die physiologische Funktion der intestinalen Peptidhormone Guanylin und Uroguanylin sowie die pathogene Wirkung der hitzestabilen Enterotoxine wird durch deren spezifische Bindung an die extrazelluläre Ligandenbindungsdomäne der GC-C vermittelt (Kapitel 1.3.1). Obwohl molekulare Details dieser Wechselwirkung und der für die Rezeptoraktivierung notwendigen Konformationsänderungen bis heute unbekannt sind, wurden durch eine Vielzahl von biochemischen Experimenten funktionell wichtige Bereiche der GC-C sowie die an der Signaltransduktion beteiligten Effektoren identifiziert (Lucas *et al.*, 2000). Ebenso kann anhand der bekannten biochemischen Daten eine Modellvorstellung für die ligandeninduzierte Aktivierung der GC-C abgeleitet werden. Dieser zufolge führt die Bindung der Liganden an die extrazelluläre Domäne der GC-C vermutlich über Konformationsänderungen dieser und der intrazellulären Kinase-homologen Domäne (KHD; vgl. Abb. 1.6 und Kapitel 1.6.4) und/oder Änderung des Oligomerzustandes (Vaandrager *et al.*, 1993; Rudner *et al.*, 1995) zur Aktivierung der katalytischen Zyklasedomänen (Kapitel 1.6.3). Dabei wird durch ligandeninduzierte Konformationsänderungen der KHD deren inhibitorische Funktion auf die katalytische Domäne aufgehoben und die cGMP-Bildung initiiert (Rudner *et al.*, 1995). Dieser intrazelluläre Botenstoff stimuliert unter anderem die Aktivität der cGMP-abhängigen Proteinkinase II (PKG-II), die den Chloridionen-Kanal CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) phosphoryliert (French *et al.*, 1995; Vaandrager *et al.*, 1997a), wodurch es zu einem verstärkten Ausstrom von Chloridionen und Hydrogencarbonat, sowie einem passiven Ausstrom von Wasser in das Darmlumen kommt (Abb. 1.5; Vaandrager *et al.*, 1997a; Vaandrager *et al.*, 1997b; Forte *et al.*, 1999). Gleichzeitig wird die elektroneutrale Natriumabsorption vermutlich über die PKG-II-vermittelte Phosphorylierung des Na^+/H^+ -Austauschers NHE-3 inhibiert (Lucas *et al.*, 2000; Vaandrager *et al.*, 2002). Neben dem beschriebenen PKG-II-abhängigen werden zwei weitere Signalwege für die

cGMP-abhängige Phosphorylierung des CFTR unter Einbeziehung der cAMP-abhängigen Proteinkinase A-II (PKA-II) beschrieben (Abb. 1.5). Zum einen kann die PKA-II durch hohe cGMP-Konzentrationen kreuzaktiviert werden und anschließend den gleichen Ionenkanal (CFTR) modulieren (Chao *et al.*, 1994), während ein zweiter Mechanismus über eine indirekte Aktivierung der PKA-II denkbar ist. Dabei kommt es durch die cGMP-spezifische Inhibition der Phosphodiesterase III (PDE-III) zu einer lokalen Erhöhung des cAMP-Spiegels und somit zur Aktivierung der PKA-II (Abb. 1.5; Lucas *et al.*, 2000; Vaandrager *et al.*, 2002).

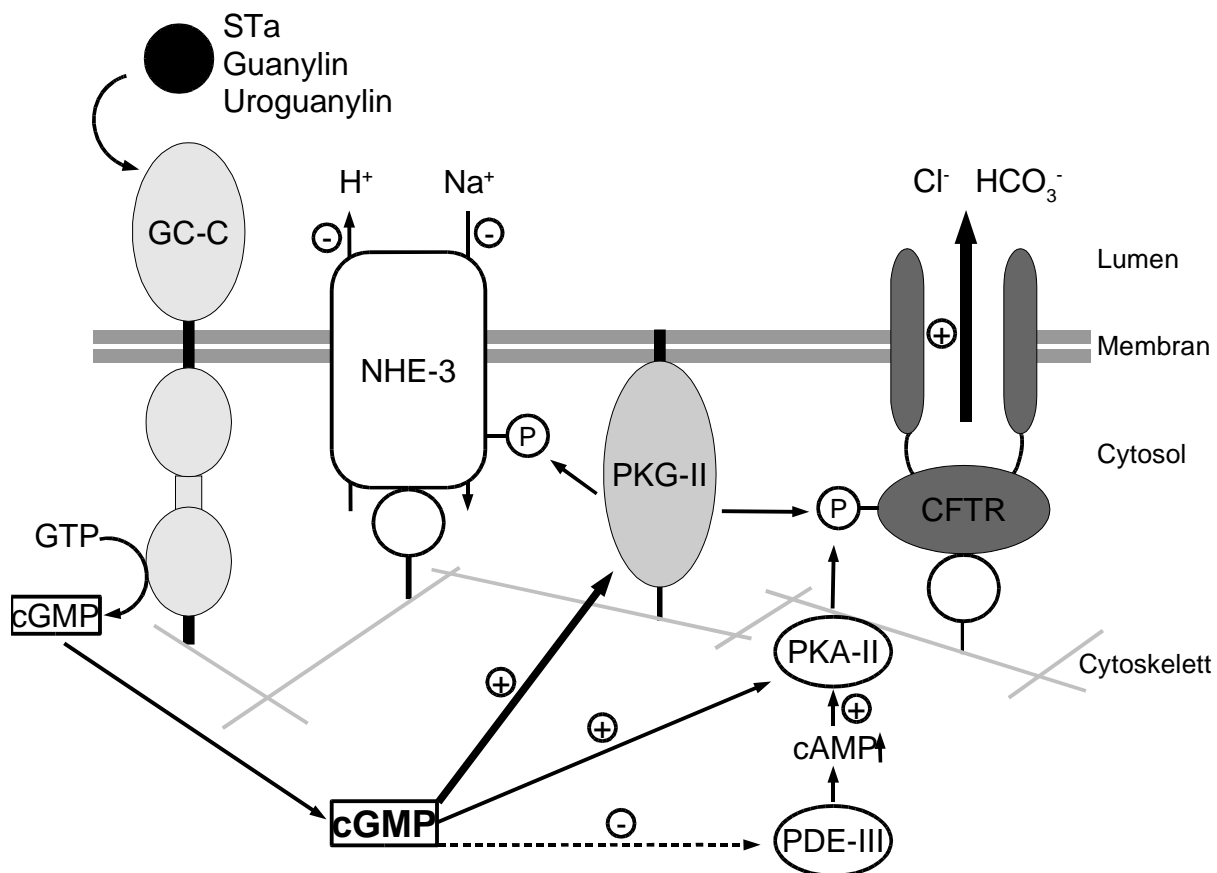


Abbildung 1.5: Die Guanylin/Uroguanylin/STa-vermittelte Regulation des Ionentransportes in der apikalen Membran intestinaler Epithelzellen. Die Aktivierung der GC-C durch die Liganden STa, Guanylin oder Uroguanylin stimuliert die Hydrogencarbonat- und Chloridsekretion durch Öffnung der Ionenkanals CFTR. Gleichzeitig wird die Natriumresorption durch Phosphorylierung des Na⁺/H⁺-Austauschers NHE-3 inhibiert. PKG-II: durch Myristoylierung membranverankerte cGMP-abhängige Proteinkinase II; PKA-II: cAMP-abhängige Proteinkinase A-II, die durch hohe cGMP-Konzentrationen kreuzaktiviert werden kann; PDE-III: durch cGMP spezifisch inhibierbare Phosphodiesterase. +: Aktivierung; -: Inhibierung; P: Phosphorylierung. Bevorzugte Signalwege sind durch größere Linienstärken angedeutet (verändert nach: Vaandrager, 2002).

Die physiologische Funktion dieser über Guanylin und Uroguanylin vermittelten Stimulation der Chlorid-, Wasser- und Hydrogencarbonat-Sekretion ist die Regulation der Fluidität des

Darminhaltes, um einerseits einen zu hohen Flüssigkeitsverlust und andererseits Verstopfung zu verhindern. Durch die Sekretion von Hydrogencarbonat ist außerdem eine Kontrolle des pH-Wertes im Darmlumen möglich, wodurch die Verdauung und die Aufnahme von Nährstoffen angeregt werden (Fawcus *et al.*, 1997; Joo *et al.*, 1998). Als weitere Funktion wurde eine mögliche Rolle bei der Na⁺-Homöostase beschrieben, die insbesondere nach der nahrungsbedingten hohen Salzaufnahme eine Limitierung der Na⁺-Absorption im Darm erfordert (Forte *et al.*, 2000; vgl. Kapitel 1.3.1). Ob diese physiologischen Funktionen der GC-C und deren Liganden unter normalen Bedingungen nur eine untergeordnete Rolle spielen oder sogar Teil eines redundanten Systems sind, ist bislang jedoch unklar, da GC-C-defiziente Mäuse gesund erschienen (Mann *et al.*, 1997; Schulz *et al.*, 1997).

1.5 Die Prohormone von Guanylin und Uroguanylin

1.5.1 Identifizierung und Aktivität

Kurze Zeit nach der erstmaligen Isolierung der endogenen GC-C-Liganden Guanylin und Uroguanylin erfolgte die Klonierung und Sequenzierung der jeweiligen cDNAs aus den intestinalen Geweben von Ratte, Maus (Guanylin) und Mensch (Guanylin und Uroguanylin) (Schulz *et al.*, 1992; Wiegand *et al.*, 1992; de Sauvage *et al.*, 1992; Hill *et al.*, 1995a; Miyazato *et al.*, 1996a). Dabei stellte sich heraus, daß es sich bei den isolierten Peptiden um die COOH-terminalen Fragmente von Vorläuferproteinen (Präprohormone) mit einer Länge zwischen 112 und 116 Aminosäuren handelte. Das letztendlich sezernierte menschliche Guanylin-Prohormon hat eine Länge von 94 Aminosäuren (de Sauvage *et al.*, 1992) und wurde in dieser Größe auch als die im Blut zirkulierende Form identifiziert (Kuhn *et al.*, 1993; Nakazato *et al.*, 1994; Hill *et al.*, 1995b). Mit 86 Aminosäuren ist das humane Uroguanylin-Prohormon etwas kleiner als Proguanylin (Hill *et al.*, 1995a; Miyazato *et al.*, 1996b).

Da beide Prohormone praktisch keine biologische Aktivität aufweisen (de Sauvage *et al.*, 1992; Schulz *et al.*, 1992; Garcia *et al.*, 1993; Hamra *et al.*, 1996; Schulz *et al.*, 1999), ist eine Prozessierung dieser Proteine zur Freisetzung der aktiven Fragmente erforderlich. Für Uroguanylin wurde sowohl ein den 16 COOH-terminalen Aminosäuren des Prohormons entsprechendes aktives Fragment aus menschlichem Urin (Kita *et al.*, 1994) als auch ein 24 Reste langes Fragment aus dem Hämofiltrat niereninsuffizienter Patienten isoliert (Hess *et al.*, 1995), die als unterschiedlich prozessierte Formen des physiologisch aktiven Peptidhormons

angesehen werden können. Im Gegensatz dazu ist über die natürliche Prozessierung von Proguanylin bis hin zum biologisch aktiven Peptid nichts bekannt. Dies ist vor allem auf das Vorliegen einer säurelabilen Asp-Pro-Peptidbindung in der Prohormonsequenz zurückzuführen (Schulz *et al.*, 1992), so daß das ursprünglich isolierte, 15 Aminosäuren lange und biologisch aktive Peptid (Currie *et al.*, 1992) vermutlich das Resultat der sauren Bedingungen bei der Extraktion aus Dünndarmextrakten ist (de Sauvage *et al.*, 1992; Nakazato *et al.*, 1994 ; Schulz *et al.*, 1999). Eine Behandlung des Prohormons mit verschiedenen Proteinasen und Aktivitätstests der entstehenden COOH-terminalen Fragmente (de Sauvage *et al.*, 1992; Garcia *et al.*, 1993; Hamra *et al.*, 1996) legen eine mögliche Spaltung mit Trypsin nahe, bei der ein 22 Aminosäuren langes aktives Fragment entsteht (de Sauvage *et al.*, 1992).

1.5.2 Die Funktion der Prosequenz bei der oxidativen Faltung

Neben der bereits beschriebenen Inaktivierung der COOH-terminalen Hormonregion der Guanylin- und Uroguanylin-Prohormone durch die jeweiligen Prosequenzen (Kapitel 1.5.1), sind diese entscheidend an der Ausbildung der für die Hormonaktivität essentiellen Disulfidisomere beteiligt. Unter oxidativen Bedingungen durchgeführte *in vitro* Rückfaltungsexperimente mit den reduzierten 15 (Guanylin) bzw. 24 (Uroguanylin) Aminosäuren langen Peptidhormonen führten fast ausschließlich zu den inaktiven Produkten, während bei den Prohormonen fast nur aktive Produkte mit nativer Disulfidverbrückung in der Hormonregionen erhalten wurden (Hidaka *et al.*, 1998; Schulz *et al.*, 1999). Weiterführende Experimente mit NH₂-terminal verkürzten Prohormonen konnten diesen essentiellen Beitrag der Prosequenzen von Guanylin und Uroguanylin vor allem auf die NH₂-terminalen Aminosäuren einschränken (Schulz *et al.*, 1999; Hidaka *et al.*, 2000).

Um jedoch genauer zu verstehen, wie die Ausbildung der nativen Disulfidbrücken erreicht wird, d.h. welche Wechselwirkungen zwischen der Hormonregion und der Prosequenz entscheidend sind, erfordert die Bestimmung der dreidimensionalen Struktur eines dieser Prohormone. Diese sollte gleichzeitig eine Grundlage für die Erklärung der fehlenden biologischen Aktivität der Prohormone darstellen.

1.5.3 Der Oligomerzustand der Guanylin- und Uroguanylin-Prohormone

Bei NMR-spektroskopischen Untersuchungen an natürlichem, aus menschlichem Hämofiltrat isoliertem Proguanylin war eine unmittelbare räumliche Nachbarschaft der NH₂- und COOH-

terminalen Bereiche dieses Proteins aufgefallen (Schulz *et al.*, 1999). Anhand dieser Beobachtung wurde eine Abschirmung der Hormonregion durch die NH₂-terminalen Aminosäuren als mögliche Ursache für die vernachlässigbare biologische Aktivität von Proguanylin postuliert. Da sowohl Proguanylin als auch Prouroguanylin bei der Größenausschlußchromatographie ein ungewöhnliches Laufverhalten gezeigt hatten (Schulz *et al.*, 1999; Hidaka *et al.*, 2000), wurde daraufhin für beide Proteine ein dimerer Assoziationsgrad in Lösung angenommen (Hidaka *et al.*, 2000). Mittels Größenausschlußchromatographie und NMR-Diffusionsmessungen wurde zuvor jedoch keine Änderung des Oligomierzustandes von Proguanylin für einen Konzentrationsbereich zwischen 1 µM und 2,4 mM festgestellt (Schulz *et al.*, 1999). Da eine reversible Oligomerisierung von der Gesamtkonzentration abhängt, favorisieren diese Ergebnisse eher einen monomeren Zustand. Das Vorliegen eines möglicherweise sehr stabilen Dimers konnte dennoch nicht ausgeschlossen werden, so daß die Frage nach dem Charakter der beobachteten Wechselwirkung zwischen den Termini von Proguanylin, d.h. ob es sich um intra- oder intermolekulare Wechselwirkungen handelt (Schulz *et al.*, 1999), zu Beginn dieser Arbeit noch immer offen war.

1.5.4 Ist die topologische Isomerie bereits in den Prohormonen realisiert?

Für die isolierten, biologisch aktiven Peptidhormone Guanylin und Uroguanylin wurde eine neue Art der topologischen Isomerie beobachtet (Kapitel 1.3.2), deren mögliche Funktion bis heute unklar ist. Ebenso war noch unklar, ob diese Art der Isomerie bereits in den Prohormonen auftritt.

Im Fall von Prouroguanylin wurde nach Freisetzung des biologisch aktiven Fragments durch Behandlung mit Arg-C fast ausschließlich das A-Isomer identifiziert (Hidaka *et al.*, 1998), so daß eine topologische Isomerie für dieses Prohormon unwahrscheinlich ist. Eine analoge Untersuchung von Proguanylin ist aufgrund der relativ hohen Umwandlungsgeschwindigkeit der Guanylin-Isomere (Kapitel 1.3.2) jedoch nicht möglich, so daß zum Beginn dieser Arbeit ein eindeutiger Nachweis für eine analoge Situation noch immer ausstanden ist.

1.6 Die Guanylatzyklase-C

Bei der gezielten Suche nach einem Rezeptor für die hitzestabilen Enterotoxine (STa) aus *E. coli* wurde ein Transmembranrezeptor mit Guanylatzyklase-Aktivität identifiziert, der als Guanylatzyklase-C bezeichnet wurde (Schulz *et al.*, 1990). Damit war die GC-C zum

Zeitpunkt ihrer Entdeckung die erste membrangebundene Guanylatzyklase, die nicht durch die natriuretischen Peptide aktiviert wurde (Schulz *et al.*, 1990). Immunohistochemischen Untersuchungen zufolge ist dieser Rezeptor in der apikalen Bürstensaummembran der Enterozyten lokalisiert (Kämpf *et al.*, 1996) und durch die Guanylin/Uroguanylin-vermittelte Aktivierung wesentlich an der Regulation des Flüssigkeitshaushaltes im Darm beteiligt (Kapitel 1.4; Abb. 1.5).

Die GC-C ist ein N-glykosylierter Transmembranrezeptor, der aus einer extrazellulären, glykosylierten Ligandenbindungsdomäne von etwa 410 Aminosäuren, einer Transmembrandomäne mit etwa 25 Resten und einer etwa 620 Aminosäuren umfassenden COOH-terminalen intrazellulären Domäne besteht. Diese kann wiederum in eine zu Proteinkinasen homologe Domäne (KHD), eine vermutlich als Oligomerisierungssequenz fungierende Linkerregion, eine katalytische Guanylatzyklase-Domäne und eine COOH-terminale unstrukturierte Region untergliedert werden (Abb. 1.6; Schulz *et al.*, 1990; Wedel & Garbers, 1998; Vaandrager, 2002). Basierend auf der Sequenzhomologie zu anderen Guanylatzyklasen und der beschriebenen Domänenstruktur gehört die GC-C der Familie der membrangebundenen Guanylatzyklasen an, die sieben mit A bis G bezeichnete Mitglieder umfaßt (Wedel & Garbers, 1998; Van den Akker, 2001).

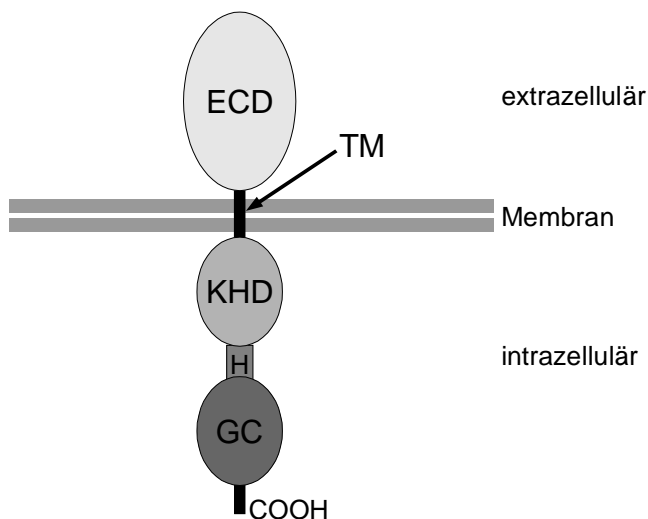


Abbildung 1.6: Schematische Darstellung der Domänenstruktur der GC-C. ECD: extrazelluläre Domäne; TM: Transmembrandomäne; KHD: zu Tyrosinkinasen homologe Domäne; H: Linkerregion (*hinge region*); GC: katalytische Guanylatzyklase-Domäne; COOH: COOH-terminale Domäne.

Die physiologischen Funktionen dieser Rezeptoren sind äußerst heterogen (Lucas *et al.*, 2000). So ist zum Beispiel die auch als ANP-Rezeptor bezeichnete GC-A an der Regulation des Blutdruckes beteiligt (Potter & Hunter, 2001), während die übrigen Rezeptoren unter anderem bei der Relaxation der glatten Muskulatur (GC-B; Lucas *et al.*, 2000), sowie der retinalen Photoadaptation und Wiederherstellung des Ca^{2+} - und cGMP-Spiegels nach

Lichtanregung (GC-E und GC-F; Dizhoor & Hurley, 1999) eine Rolle spielen. Die Aktivierung dieser Rezeptoren erfolgt in den meisten Fällen durch Bindung eines Liganden an die extrazelluläre Domäne. Eine Ausnahme bilden die retinalen (GC-E und -F) und die in olfaktorischen Sinneszellen (GC-D) vorkommenden Rezeptoren, die durch intrazelluläre Bindung eines Proteins (GCAP, *guanylyl cyclase activating protein*; Fulle *et al.*, 1995; Dizhoor & Hurley, 1999) aktiviert werden.

Entsprechend den Funktionen der verschiedenen Rezeptordomänen besitzen diese innerhalb der Familie der Rezeptor-Guanylatzyklen deutlich unterschiedliche Homologiegrade. Während sich die COOH-terminalen intrazellulären Domänen aller Mitglieder der Familie der membrangebundenen Guanylatzyklen durch eine hohe Sequenzidentität auszeichnen, wird für die extrazellulären Domänen nur eine relativ geringe Homologie beobachtet.

1.6.1 Der Oligomerzustand der Guanylatzyklase-C

Wie die übrigen Mitglieder der Familie der membrangebundenen Guanylatzyklen liegt auch die GC-C schon vor Ligandenbindung als Homooligomer in der Membran vor (Chinkers & Wilson, 1992; Vaandrager *et al.*, 1994; Garbers, 1999; Hasegawa *et al.*, 1999a). Berücksichtigt man die beschriebene Notwendigkeit für der Ausbildung von homodimeren katalytischen Domänen (vgl. Kapitel 1.6.3; Liu *et al.*, 1997; Hurley, 1998), erscheint für die GC-C ein dimerer oder tetramerer Assoziationsgrad plausibel, der bereits für andere Guanylatzyklen beschrieben ist (Chinkers & Wilson, 1992; Van den Akker *et al.*, 2000; Potter & Hunter, 2001). Die genaue Anzahl der Monomere pro GC-C-Oligomer ist jedoch nach wie vor nicht eindeutig geklärt, da *Crosslink*-Studien sowie Größenausschlußchromatographie-Experimente auf das Vorliegen von trimeren intra- und extrazellulären Domänen hinweisen (Hasegawa *et al.*, 1999a; Vijayachandra *et al.*, 2000). Dieser trimere Zustand scheint dabei erst durch Ligandenbindung stabilisiert zu werden (Hasegawa *et al.*, 1999a). Da die Experimente zur Bestimmung des Assoziationsgrades unter anderem mit isolierten extrazellulären bzw. intrazellulären Domänen durchgeführt wurden, scheinen die für die Oligomerisierung verantwortlichen Bereiche sowohl intra- als auch extrazellulär lokalisiert zu sein, wobei die intrazelluläre Linkersequenz zwischen KHD und katalytischer Domäne (Abb. 1.6) als potentielle Multimerisierungssequenz angenommen wird (Vijayachandra *et al.*, 2000).

1.6.2 Die COOH-terminale Domäne

Im Gegensatz zu den Guanylatzyklasen A und B besitzt die GC-C eine zusätzliche, etwa 60 Aminosäuren lange COOH-terminale Region (Abb. 1.6), deren genaue Funktion bislang nicht eindeutig bekannt ist. So wird neben einer für die Aktivität der GC-C essentiellen Wechselwirkung dieser Domäne mit dem Cytoskelett (Schulz *et al.*, 1990; Lucas *et al.*, 2000) eine Proteinkinase C abhängige Phosphorylierung zur Regulation der katalytischen Aktivität beschrieben (Wada *et al.*, 1996b). Da die übrigen, an der GC-C vermittelten Signaltransduktion (Kapitel 1.4) beteiligten Komponenten (cGKII, CFTR, NHE-3) ebenfalls membran- und cytoskelettgebunden vorliegen, könnten diese Moleküle in einem hochmolekularen Signaltransduktionskomplex organisiert vorliegen (Abb. 1.5; Vaandrager, 2002).

1.6.3 Die katalytische Guanylatzyklase-Domäne

Adenylat- und Guanylatzyklasen zeichnen sich neben der funktionellen Ähnlichkeit, nämlich der Katalyse stereochemisch analoger Reaktionen, auch durch eine hohe Sequenzidentität aus, die unter anderem die Molekülmodellierung der katalytischen Domäne der membran- gebundenen retinalen Guanylatzyklase erlaubte (Liu *et al.*, 1997). Demnach stellen deren katalytische Domänen Homodimere mit zwei aktiven Zentren dar, die sich in einer durch die beiden monomeren Hälften gebildeten Spalte befinden. Beide aktiven Zentren werden dabei jeweils durch Aminosäuren beider Untereinheiten gebildet, so daß es erst nach Dimerisierung zur Ausbildung einer funktionellen Einheit kommt (Liu *et al.*, 1997).

Da die katalytischen Domänen der unterschiedlichen membrangebundenen Guanylatzyklasen neben der analogen Funktion der cGMP-Bildung mit 46 bis 55 % Sequenzidentität auch die höchste Homologie der einzelnen Domänen zueinander aufweisen (Schulz *et al.*, 1990), können für alle Mitglieder dieser Familie, einschließlich der GC-C, übereinstimmende Strukturen der katalytischen Domänen angenommen werden (Lucas *et al.*, 2000).

1.6.4 Die Kinase-homologe Domäne

Die Kinase-homologe Domäne der GC-C ist intrazellulär zwischen Transmembran- und katalytischer Zyklasedomäne lokalisiert (Abb. 1.6) und ähnelt den katalytischen Domänen der Rezeptor-Tyrosinkinasen. Das Fehlen einer bei Proteinkinasen konservierten Glycin-reichen Sequenz sowie eines an der Positionierung der γ -Phosphatgruppe von ATP beteiligten

Aspartatrestes weisen jedoch auf eine fehlende katalytische Aktivität der KHD der GC-C hin (Schulz *et al.*, 1990; Bhandari *et al.*, 2001). Da *in vitro* auch in Abwesenheit von ATP eine Aktivierung der GC-C durch die Liganden erfolgt, die durch ATP-Zugabe gesteigert werden kann, scheint die KHD eine rein regulatorische Funktion zu besitzen und ATP zwar binden, jedoch nicht hydrolysieren zu können (Schulz *et al.*, 1990; Vaandrager *et al.*, 1993; Bhandari *et al.*, 1999; Bhandari *et al.*, 2001). Diese Annahme wurde durch Mutationsstudien mit Rezeptoren ohne KHD bestätigt, bei denen keine ligandeninduzierte Aktivierung mehr möglich war (Rudner *et al.*, 1995). Weiterführende Arbeiten konnten durch Homologie-modellierung und gerichtete Mutagenese zeigen, daß die Fähigkeit der KHD zur ATP-Bindung wichtig für die Rezeptoraktivierung durch die Liganden ist und diese Domäne daher als eine Art Schalter bei der Übertragung des Signals von der extrazellulären auf die katalytische Domäne fungiert (Bhandari *et al.*, 2001).

1.6.5 Die extrazelluläre Ligandenbindungsdomäne der Guanylatzyklase-C

Die die Bindungsregion für die Liganden Guanylin, Uroguanylin und STa enthaltende extrazelluläre Domäne der GC-C (GC-C_{ECD}) bildet eine eigenständige Faltungseinheit, die in löslicher Form separat exprimiert werden kann. Diese lösliche Rezeptordomäne zeigt zur membrangebundenen Form ähnliche Bindungseigenschaften bezüglich den aufgeführten Liganden (Hasegawa *et al.*, 1999a). Basierend auf Sekundärstrukturvorhersagen wird die GC-C_{ECD} in eine α/β -reiche, über Disulfidbrücken stabilisierte Region und in eine membrannähe, flexiblere, β -faltblattreiche Region unterteilt (Hasegawa *et al.*, 1999b). Letztere scheint die Ligandenbindungsregion zu enthalten (Wada *et al.*, 1996a; Hasegawa *et al.*, 1999b). Ein weiteres Charakteristikum der GC-C_{ECD} ist ein hoher Anteil von N-Glykanen, deren genaue Anzahl je nach Organismus zwischen 8 und 10 variiert. Diese Glykane scheinen zwar nicht direkt an Wechselwirkungen mit den Liganden beteiligt zu sein, besitzen jedoch eine für die Rezeptoraktivierung wichtige stabilisierende Funktion für die Struktur der extrazellulären Domäne (Hasegawa *et al.*, 1999c). Dieser stabilisierende Einfluß auf die Ligandenbindungsdomänen wurde auch bei anderen Mitgliedern der membrangebundenen Guanylatzyklasen, wie zum Beispiel der GC-A, beobachtet (Heim *et al.*, 1996; Potter & Hunter, 2001).

2. Ziele

Bei früheren NMR-spektroskopischen Untersuchungen an natürlichem, humanem Proguanylin war aufgrund einer ausgeprägten Überlagerung von Resonanzen in den aufgenommenen homonuklearen ^1H -2D-NMR Spektren keine vollständige Zuordnung der Resonanzen möglich gewesen (Schulz *et al.*, 1999). Diese ist jedoch eine Voraussetzung für die Bestimmung der dreidimensionalen Struktur eines Proteins in Lösung. In der vorliegenden Arbeit sollte daher die vollständige sequenzspezifische Zuordnung der Resonanzen durch die Markierung von Proguanylin mit den NMR-aktiven Stickstoff- und Kohlenstoffisotopen ^{15}N und ^{13}C und der Durchführung dreidimensionaler NMR-Experimente ermöglicht werden.

Zu diesem Zweck sollte zunächst ein geeignetes System zur Expression von Proguanylin in *E. coli* etabliert und das rekombinante Protein gereinigt und spektroskopisch untersucht werden. Da die zum Beginn dieser Arbeit bekannte Literatur keine eindeutige Aussage über den Oligomerzustand von Proguanylin erlaubte (Kapitel 1.5.3), sollte dieser mittels analytischer Ultrazentrifugation eindeutig bestimmt werden. Nach Isotopenmarkierung sollten die anschließenden NMR-spektroskopischen Untersuchungen die Strukturbestimmung von Proguanylin ermöglichen, wobei der zuvor bestimmte Assoziationsgrad als Grundlage für die Strategie der Strukturbestimmung dienen sollte. Die schließlich erhaltene Struktur sollte bezüglich der folgenden, zum Teil bereits in der Einleitung aufgeworfenen Fragen analysiert und interpretiert werden:

- Sind bereits Strukturen mit einer homologen Faltungstopologie bekannt?
- Weist die Hormonregion von Proguanylin eine mit dem freien, biologisch aktiven Hormon vergleichbare Struktur auf, und kann die topologische Isomerie von Guanylin bereits bei Proguanylin beobachtet werden?
- Falls diese Isomerie bei Proguanylin nicht realisiert ist, welches der beiden Isomere wird in der Struktur des Prohormons fixiert?
- Liefert die Struktur von Proguanylin eine Erklärung für die fehlende biologische Aktivität dieses Prohormons?
- Welche Rolle spielt die Prosequenz bei der Ausbildung der nativen Disulfidisomere der Hormonregion und warum sind dabei vor allem die NH_2 -terminalen Aminosäuren von Bedeutung?
- Sind die für die notwendige Prozessierung von Proguanylin in Frage kommenden Bereiche, die zur Freisetzung eines biologisch aktiven Fragmentes führen, exponiert und

erlauben somit eine Prozessierung ohne Entfaltung des Prohormons?

Neben der Strukturbestimmung von Proguanylin sollte eine Grundlage für weiterführende Untersuchungen der Wechselwirkung zwischen den GC-C-Liganden und ihrem Rezeptor geschaffen werden. Wie bereits erwähnt (Kapitel 1.1 und 1.4), ist bislang nichts über die molekularen Details der Wechselwirkung von Guanylin bzw. Uroguanylin und STa mit der GC-C bekannt. NMR-spektroskopische Untersuchungen dieser Wechselwirkung werden jedoch durch die Größe und den Assoziationsgrad der extrazellulären Ligandenbindungsdomäne dieses Rezeptors erheblich erschwert (Kapitel 1.6). Um dennoch eine Untersuchung der Liganden/GC-C-Interaktion mit dieser Methode zu ermöglichen, sollte daher im Rahmen dieser Arbeit ein geeignetes Fragment der extrazellulären Domäne der GC-C mit den folgenden Eigenschaften konstruiert werden: Es sollte eine für die NMR Spektroskopie zugängliche Größe aufweisen, d.h. ein Molekulargewicht bis maximal 25 kDa besitzen und eine lösliche, eigenständige Faltungseinheit bilden, die eine zur gesamten GC-C_{ECD} ähnliche Affinität bezüglich den GC-C-Liganden besitzt.

3. Materialien

3.1 Bakterienstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterien (Tabelle 3.1) gehören ausschließlich der Spezies *Escherichia coli* an.

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> Top10	F ⁻ , <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr</i> ⁻ , <i>hsdRMS</i> ⁻ , <i>mcrBC</i>), φ80 <i>lacZ</i> ΔM15, Δ <i>lacX</i> 74, <i>deoR</i> , <i>recA</i> 1, <i>araD</i> 139 Δ(<i>ara-leu</i>)7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> (Str ^R), <i>endA</i> 1, <i>nupG</i>	Grant <i>et al.</i> (1990)
<i>E. coli</i> AD494(DE3)	Δ <i>ara-leu</i> 7697, Δ <i>lacX</i> 74, Δ <i>phoA</i> P <i>vu</i> II, <i>phoR</i> , Δ <i>malF</i> 3, F'[<i>lac</i> ⁻ (<i>lacI</i> ^q) <i>pro</i>], <i>trxB</i> :: kan, (DE3)	Derman <i>et al.</i> (1993)
<i>E. coli</i> Origami(DE3)	Δ <i>ara-leu</i> 7697, <i>araD</i> 139, Δ <i>lacX</i> 74, <i>galE</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> , Δ <i>phoA</i> P <i>vu</i> II, <i>phoR</i> , F'[<i>lac</i> ⁻ (<i>lacI</i> ^q) <i>pro</i>], <i>gor522</i> ::Tn10 (Tc ^R), <i>trxB</i> ::kan, (DE3)	Derman <i>et al.</i> (1993) Prinz <i>et al.</i> (1997)

Tabelle 3.1: Zusammenstellung der in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme unter Angabe des jeweiligen Namen, Genotyps und der dazugehörenden Referenz.

3.1.1 *E. coli* Top10

Zur Transformation und Gewinnung rekombinanter Plasmide wurde der Stamm *E. coli* Top10 verwendet.

Dieser Stamm besitzt eine hohe Transformationseffizienz, und durch die Abwesenheit von Restriktionsenzymen (*hsdRMS*⁻) wird der Abbau von Plasmid-DNA verhindert. Außerdem ist die Integration von Plasmid-DNA in das Bakterienchromosom in diesem rekombinationsnegativen Stamm (*recA*1) äußerst unwahrscheinlich.

Der Marker φ80*lacZ*ΔM15 eröffnet zudem die Möglichkeit der α-Komplementation, von der nur in Kombination mit dem Phagemid-Vektor pBlueskript II KS Gebrauch gemacht wurde.

3.1.2 *E. coli* AD494(DE3) und Origami(DE3)

E. coli AD494(DE3) und Origami(DE3) sind Derivate des *E. coli* K-12-Stammes und wurden für die Expression von Fusionsproteinen aus Thioredoxin und Proguanylin, Proguanylin-Derivaten, bzw. miniGC-C verwendet.

Diese Stämme ermöglichen die Expression rekombinanter Proteine, deren Gene unter der Kontrolle eines T7-Promotors und *lacO*-Operators stehen. Erreicht wird dies durch den Bakteriophagen DE3 – ein λ -Derivat – welcher als Prophage in das Bakterienchromosom integriert ist. In das *int*-Gen von DE3 sind die Gene für den Lactoserepressor (*lacI*) und für die T7-RNA-Polymerase inseriert, so daß der Prophage das Bakterienchromosom nicht ohne Helferphagen verlassen kann. Das Gen für die T7-RNA-Polymerase steht unter der Kontrolle des *lacUV5*-Promotors und des *lacO*-Operators, so daß nach Zugabe von Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid (IPTG) die Expression der T7-RNA-Polymerase induziert wird. Diese transkribiert ausschließlich Gene, die unter der Kontrolle eines T7-Promotors und *lacO*-Operators stehen.

Eine Besonderheit dieser Stämme ist ein oxidatives Milieu im Cytoplasma, welches die Ausbildung von Disulfidbrücken ermöglicht und die Ausbeute löslicher und aktiver disulfidverbrückter Proteine deutlich erhöht. Erreicht wird dies durch Mutationen in den Genen für die Thioredoxin Reduktase (*trxB::kan*; beide Stämme) und die Glutathion Reduktase (*gor522::Tn10* (Tc^R); nur Origami(DE3)).

AD494- und Origami-Stämme sind kompatibel mit Ampicillinresistenz-vermittelnden Plasmiden. Für das Wachstum auf M9-Minimalmedium benötigen beide Stämme zusätzlich L-Leucin (40 μ g/ml).

3.2 Plasmide

In Tabelle 3.2 sind die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide zusammengestellt.

Plasmid/Phagemid	Eigenschaften	Referenz
pBlueskript II KS	Klonierungsvektor	Stratagene (La Jolla, CA, USA)
pBlueKS- <i>miniGC-C</i>	Klonierungsvektor; das Gen für miniGC-C ist in die MCS inseriert.	diese Arbeit
pGEM-T	Klonierungsvektor	Promega (Mannheim)

Plasmid/Phagemid	Eigenschaften	Referenz
pGEM-T-EK/Xa- <i>proguanylin</i>	Klonierungsvektor; das Gen für Proguanylin mit NH ₂ -terminaler Spaltstelle für Enterokinase, bzw. Faktor Xa ist in die MCS inseriert.	Dr. Jürgen Mägert, IPF PharmaCeuticals, Hannover
pET-32a	Expressionsvektor mit T7-Promotor, <i>lacO</i> -Operator und DNA-Sequenzen für einen NH ₂ -terminalen Thioredoxin- (Trx) und Hexahistidin- (His ₆ -tag) Anhang, sowie eine Thrombin- und Enterokinase (EK)-spaltstelle.	Novagen (Madison, USA)
pET-32a-EK- <i>proguanylin</i>	pET-32a-Derivat, das Gen für Proguanylin mit NH ₂ -terminaler Spaltstelle für Enterokinase ist in die MCS inseriert.	diese Arbeit
pET-32a-Xa- <i>proguanylin</i>	pET-32a-Derivat, das Gen für Proguanylin mit NH ₂ -terminaler Spaltstelle für die Faktor Xa ist in die MCS inseriert.	diese Arbeit
pET-32a-pres- <i>proguanylin</i>	pET-32a-Derivat, das Gen für Proguanylin mit NH ₂ -terminaler Spaltstelle für Prescission ist in die MCS inseriert.	diese Arbeit
pET-32a-Asp-pres- <i>proguanylin</i>	pET-32a-Derivat, das Gen für Proguanylin mit NH ₂ -terminaler Spaltstelle für Prescission ist in die MCS inseriert; vor die PreScission-Spaltstelle ist das Gen für 5 Aspartat-Reste kloniert.	diese Arbeit
pET-32a-pres- <i>proguanylin</i> - $\Delta(28-37)$	pET-32a-Derivat, das Gen für Proguanylin- $\Delta(28-37)$ mit NH ₂ -terminaler Spaltstelle für PreScission ist in die MCS inseriert.	diese Arbeit
pET-32a-pres- <i>proguanylin</i> -c48s/c61s	pET-32a-Derivat, das Gen für Proguanylin-C48S/C61S mit NH ₂ -terminaler Spaltstelle für PreScission ist in die MCS inseriert.	diese Arbeit
pET-32a-pres- <i>proguanylin</i> -c86s/c94s	pET-32a-Derivat, das Gen für Proguanylin-C86S/C94S mit NH ₂ -terminaler Spaltstelle für PreScission ist in die MCS inseriert.	diese Arbeit
pET-32a-pres- <i>miniGC-C</i>	pET-32a-Derivat, das Gen für miniGC-C mit NH ₂ -terminaler Spaltstelle für PreScission ist in die MCS inseriert.	diese Arbeit

Tabelle 3.2: Zusammenstellung der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide unter Angabe der Eigenschaften und der Herkunft. Zur Selektion besitzen alle Plasmide eine Ampicillinresistenz.

3.2.1 pBlueskript II KS

pBlueskript II KS ist ein 2,9 kb großer *high copy number* Phagemid-Vektor (Abb. 3.1), der besonders für Klonierungen geeignet ist. Die erweiterte Klonierungsstelle (*multiple cloning site*, MCS) liegt im β -Galaktosidase-Gen (*lacZ*), wodurch das Blau-Weiß-*screening* bei

Bakterienstämmen mit geeignetem Marker ($\phi 80lacZ\Delta M15$) ermöglicht wird.

Bei der Klonierung von miniGC-C wurde pBlueskript II KS zur Klonierung und Gewinnung von Plasmid-DNA für die Sequenzierung verwendet. Der Einbau des Gens für miniGC-C erfolgte über die *Bam*HI/*Xba*I-Schnittstellen der MCS. Bei *E. coli* Top10-Zellen (Kapitel 3.1.1) konnte von der α -Komplementation zur Selektion positiver Transformanten Gebrauch gemacht werden.

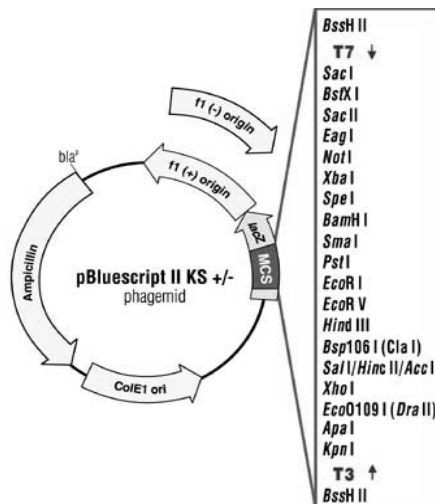


Abbildung 3.1: Plasmidkarte von pBlueskript II KS (aus: Stratagene Katalog, 2003). Ampicillin: Selektionsmarker für Ampicillin-Resistenz; ColE1 ori: Plasmid-Replikationsursprung; f1 (+) origin: Replikationsursprung des Bakteriophagen f1 zur Produktion einzelsträngiger DNA; *lacZ*: Gen für die β -Galaktosidase; MCS: (*multiple cloning site*) enthält verschiedene singuläre Restriktionsschnittstellen. Der Einbau von DNA-Sequenzen erlaubt das Blau-Weiß-*screening* bei Bakterienstämmen mit geeignetem Marker ($\phi 80lacZ\Delta M15$).

3.2.2 pET-32a

pET-32a wurde für die induzierbare Überexpression von Genen als Fusionsprotein mit *E. coli*-Thioredoxin (*trx*A) entwickelt (Novy *et al.*, 1995).

LaVallie *et al.* (1993) haben gezeigt, daß Thioredoxin als Fusionspartner die Löslichkeit der im Cytoplasma von *E. coli* gebildeten heterologen Proteine deutlich steigern kann. Viele in *E. coli* normalerweise als unlösliche Aggregate (*inclusion bodies*) gebildeten Proteine können so in löslicher und biologisch aktiver Form erhalten werden. Die Ausbeute an aktiven und löslichen disulfidverbrückten Proteinen kann durch Kombination der Thioredoxin-Fusionen mit Thioredoxin Reduktase negativen (*trx*B⁻) *E. coli*-Stämmen verbessert werden. In solchen Stämmen scheint Thioredoxin eine der *in vivo*-Funktion entgegengesetzte Rolle zu spielen und die Ausbildung von Disulfidbrücken im hier oxidativen Cytoplasma zu katalysieren (Stewart *et al.*, 1998).

Der Einbau des Gens für das zu exprimierende Protein erfolgt über eine MCS hinter dem Thioredoxin-Gen (*trx*A) und einer DNA-Sequenz, die für einen Hexahistidin-Anhang (His₆-tag) und eine Proteinase-Schnittstelle kodiert. Der His₆-tag ermöglicht die Reinigung des Fusionsproteins über immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie (Porath, 1992).

Das Zielprotein wird durch Abspaltung des Thioredoxin/Histidin-Anhangs (Trx-tag) mittels einer Proteinase und erneuter Chromatographie an einer Nickelsäule erhalten.

Das *trxA*-Gen steht unter der Kontrolle des T7-Promotors und des *lacUV5*-Operators, so daß die Expression durch IPTG-Zugabe induziert werden kann (Kapitel 3.1.2).

Die Plasmidkarte von pET-32a mit einem Ausschnitt aus der MCS ist in Abbildung 3.2 dargestellt.

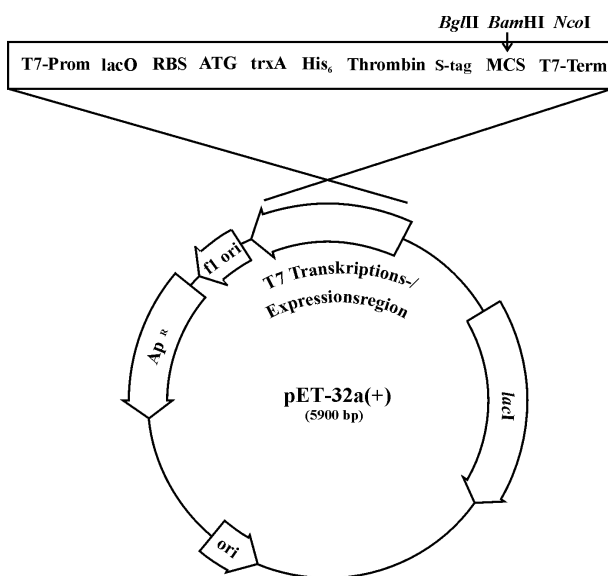


Abb. 3.2: Plasmidkarte von pET-32a (verändert nach: pET system manual, Novagen, 2003). Der Einbau des Gens für das zu exprimierende Protein erfolgt über eine MCS hinter dem Thioredoxin-Gen (*trxA*) und einer DNA-Sequenz, die für einen His₆-tag kodiert. Die Expression des Fusionsproteins kann durch Zugabe von IPTG induziert werden. Das Ende der Transkriptionsregion wird durch den T7-Terminator bestimmt. ori: (pBR322 origin) Plasmid-Replikationsursprung; f1 ori: Replikationsursprung des Bakteriophagen f1 zur Produktion einzelsträngiger DNA; *lacI*: Gen für den LacI-Repressor; Ap^R: Selektionsmarker für Ampicillinresistenz.

3.2.3 pET-32a-proguanylin-Derivate

Bei allen pET-32a-proguanylin-Derivaten (vgl. Tabelle 3.2) sind die Gene für Proguanylin und die aufgeführten Proguanylin-Mutanten mit NH₂-terminalen Spaltstellen für jeweils eine der Proteinasen Enterokinase, Faktor Xa oder PreScission über die *Bgl*II- und *Nco*I-Schnittstelle kloniert.

3.2.4 pET-32a-miniGC-C

Bei diesem pET-32a-Derivat ist das Gen für miniGC-C mit NH₂-terminaler Spaltstelle für PreScission über die *Bgl*II- und *Bam*HI-Schnittstelle kloniert.

3.2.5 pGEM-T

Dieses 3 kb große *high copy number* Plasmid (Abb. 3.3) ist besonders für Klonierungen geeignet und ermöglicht wie pBlueskript II KS das Blau-Weiß-*sreening* bei Bakterienstämmen mit geeignetem Marker ($\phi 80lacZ\Delta M15$) (Kapitel 3.2.1).

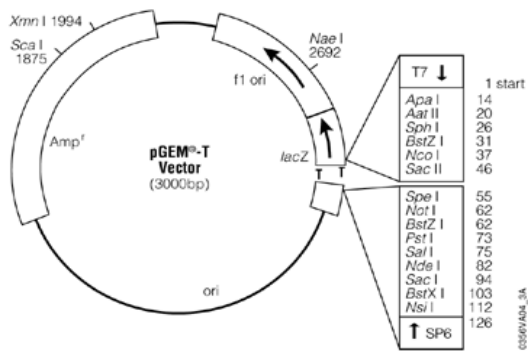


Abbildung 3.3: Plasmidkarte von pGEM-T (aus: Stratagene Katalog, 2003). *Amp^r*: Selektionsmarker für Ampicillin-Resistenz; *ori*: Plasmid-Replikationsursprung; *f1 ori*: Replikationsursprung des Bakteriophagen f1 zur Produktion einzelsträngiger DNA; *lacZ*: Gen für die β -Galaktosidase; die MCS: (*multiple cloning site*) ist durch die unterschiedlichen singulären Restriktionsschnittstellen gekennzeichnet. Der Einbau von DNA-Sequenzen erlaubt das Blau-Weiß-*sreening* bei Bakterienstämmen mit geeignetem Marker ($\phi 80lacZ\Delta M15$).

Die pGEM-T-Derivate pGEM-T-EK/Xa-*proguanylin* wurden von Dr. Jürgen Mägert (IPF PharmaCeuticals, Hannover) zur Verfügung gestellt. Das Gen für Proguanylin ist mit NH₂-terminaler Spaltstelle für Enterokinase bzw. Faktor Xa bidirektional über die *NcoI*-Schnittstelle kloniert.

3.3 Oligonukleotide

In Tabelle 3.3 sind alle in dieser Arbeit eingesetzten Oligonukleotide aufgeführt. Sie wurden von der Firma BioTez (Berlin) bezogen.

Name	Sequenz	Länge	Verwendungs-zweck
progua_EK_5'	5'-GGA GGA A GAT CTG GGT GAC GAC GAC GAC AAG GTC ACC GTG CAG GAT GGA AAT TTC TCC-3'	58mer	(a), (b)
progua_Xa_5'	5'-GGA GGA A GAT CTG GGT ATT GAG GGT CGC GTC ACC GTG CAG GAT GGA AAT TTC TCC-3'	55mer	(a), (b)
pres-progua_5'	5'-GGA GGA A GAT CTG GGT CTG GAA GTT CTG TTC CAG GGG CCC GTC ACC GTG CAG GAT GGA AAT TTC TCC-3'	67mer	(a), (b)

Name	Sequenz	Länge	Verwendungs- zweck
progua_3'	5'-GGA GGA CCA TGG TTA GCA TCC GGT ACA GGC AGC GTA GG-3'	38mer	(a), (b)
asp-pres-progua_5'	5'-GGA GGA A GAT CTG GGT GAC GAC GAC GAC GAC CTG GAA GTT CTG TTC CAG GGG CCC GTC-3'	58mer	(a), (b)
deletion_progua_5'	5'-GGA GGA CCC CAG GAG CCC ATC CCT GGT GAA CCT GTG GTT CCC ATC CTC-3'	48mer	(d)
deletion_progua_3'	5'-GGA GGA TTC ACC AGG GAT GGG CTC CTG GGG CTC CTG GAG GTC TTT GAG-3'	48mer	(d)
progua_C61S_5'	5'-GGA GGA AAC CCG AAC TTT CCA GAA GAA CTC AG CCT CTC AGC AAG GAG CCC AAT GCC-3'	57mer	(d)
progua_C48S_3'	5'-GGA GGA GAG TTC TTC TGG AAA GTT CGG GTT GCT GCT GAG GAT GGG AAC CAC-3'	51mer	(d)
progua_C86S/C94S_3'	5'-CCA TGG TTA GCT TCC GGT ACA GGC AGC GTA GGC GCT GAT TTC ACA TG-3'	47mer	(e)
T7-Terminator	5'-GGG GTT ATG CTA GTT ATT GG-3'	20mer	(c)
M13 forward	5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3'	17mer	(c)
miniGC-C_1	5'-GGA GGA TCT AGA A GAT CTG GGT CTG GAA GTT CTG TTC CAG GGG CCC TCT CCA GCA AGG AAG CTG ATG TAC TTC-3'	70mer	(a), (b), (d)
miniGC-C_2	5'-CAT AGT ATC GCC CGG CGC CAG TGT CAG AAC CAG AAC ATT TTT CAT ATA GTC-3'	51mer	(d)
miniGC-C_3	5'-ACA CTG GCG CCG GGC GAT ACT ATG TTT CTC CTG TAC ACC TCT GTG-3'	45mer	(d)
betaGC-3'	5'-GGA GGA GGA TCC TTA TTG AGG GCC CCG GCC TGG AAT ATC-3'	39mer	(a), (b), (d)

Tabelle 3.3: Zusammenstellung der verwendeten Oligonukleotide unter Angabe des jeweiligen Namen, Sequenz, Länge und Verwendungszweck. (a) PCR mit Linker-Primern; (b) Kolonie-PCR; (c) Sequenzierung; (d) *splicing-by-overlap-extension*-PCR-Mutagenese; (e) *QuickChange*-Mutagenese.

3.4 Nährmedien

Alle Medien wurden mit deionisiertem Wasser angesetzt und durch 20-minütiges Autoklavieren bei 121 °C (Autoklav Typ 23 bzw. Varioklav, Melag, Berlin) sterilisiert. Zur Herstellung von Agarplatten wurde den Medien 15 g/l Agar zugesetzt.

Für die Herstellung von Selektivmedien wurde den sterilisierten Medien nach Abkühlen auf etwa 50 °C sterilfiltriertes (0,2 µm Filter, Sartorius, Göttingen) Antibiotikum (Endkonzentrationen: Ampicillin 100 µg/ml; Kanamycin 15 µg/ml; Tetracyclin 12,5 µg/ml) zugegeben.

LB-Medium (Luria Bertani)

10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, *ad* 1000 ml H₂O.

Minimalmedium

Zur Bakterienanzucht in Minimalmedium wurde M9-Minimalmedium (Sambrook *et al.*, 1989) verwendet, das mit TS2 Spurenelementlösung (Meyer & Schlegel, 1983) und Vitamin B₁-Hydrochlorid (Merck, Darmstadt) ergänzt wurde.

5 x M9-Medium: 85,5 g Na₂HPO₄ · 12 H₂O, 15,0 g KH₂PO₄, 2,5 g NaCl, 5,0 g NH₄Cl, bzw. ¹⁵NH₄Cl, *ad* 1000 ml H₂O.

Spurenelementlösung TS2: 100 mg ZnSO₄ · 7 H₂O, 30 mg MnCl₂ · 4 H₂O, 300 mg H₃BO₃, 200 mg CoCl₂ · 6 H₂O, 20 mg NiCl₂ · 6 H₂O, 10 mg CuCl₂ · 2 H₂O, 900 mg Na₂MoO₄ · 2 H₂O, 20 mg Na₂SeO₃, *ad* 1000 ml H₂O.

Zur Herstellung von 1 l Minimalmedium wurden 200 ml 5 x M9-Medium mit 800 ml Wasser versetzt und autoklaviert. Anschließend wurden folgende autoklavierten bzw. sterilfiltrierten Lösungen gegeben: 2,0 ml 1M MgSO₄, 2,0 ml TS2-Lösung, 1,0 ml 10 mM Fe(III)citrat, 20 ml 20 % (w/v) Glukose bzw. 10 ml 20 % ¹³C-Glukose, 100 µl 1M CaCl₂, 100 µl 0,5 % (w/v) Vitamin B₁, 1,0 ml (40 mg/ml) L-Leucin bzw. ¹⁵N-L-Leucin.

3.5 Enzyme, Proteine, Standards und Chemikalien

Herkunft der in dieser Arbeit verwendeten Enzyme, Standards und Proteine

Bio-Rad (München): Proteinstandard (*low range*; Phosphorylase B: 97,4 kDa; Rinderserumalbumin: 66,2 kDa; Ovalbumin: 45,0 kDa; Carboanhydrase: 31,0 kDa; Trypsininhibitor: 21,5 kDa; Lysozym: 14,4 kDa); GibcoBRL (Eggenstein): T4-DNA-Ligase (hc); MBI Fermentas (Vilna, Litauen): *Bam*HI, *Bgl*II, *Nco*I, *Xba*I, *Pfu*- und *Taq*-DNA-Polymerase, pUC19/*Msp*I-Standard (Fragmentgrößen: 501 bp; 489 bp; 242 bp; 190 bp; 147 bp; 111 bp; 110 bp; 67 bp; 34 bp; 26 bp), λ -DNA, *Hind*III; New England Biolabs (Schwalbach, Taunus): *Vent*-DNA-Polymerase; Novagen (Madison, USA): rekombinate Enterokinase, Faktor Xa; Pharmacia (Freiburg): PreScission Protease; Roche Molecular Biochemicals (Mannheim): *shrimp* alkalische Phosphatase; Sigma (München): Lysozym.

Chemikalien

GERBU (Gaiberg): IPTG, Ampicillin, Kanamycinsulfat; Cambridge Isotope Laboratories (Andover, USA): ^{15}N -Ammoniumchlorid; CAMPRO (Veenendaal, Niederlande): ^{15}N -L-Leucin (>98 % ^{15}N), ^{13}C -Glukose (99 % ^{13}C); Eurisotop (Gif-sur-Yvette, Frankreich): D_2O (99,8 % D); Fluka (Neu-Ulm): Agar, Coomassie Brilliant Blau, β -Mercaptoethanol, Ethidiumbromid, Tetracyclin-Hydrochlorid, Trifluoressigsäure, Vitamin B₁-Hydrochlorid; Roche (Mannheim): Proteaseinhibitorcocktail Complete EDTA-free; Roth (Karlsruhe): Acrylamidfertiglösungen, Agarose, Imidazol, MES, Pepton, Hefeextrakt, 4 x Roti-Load[®] Probenpuffer; Serva (Heidelberg): L-Leucin, N-,N-,N',N'-Tetramethylenethyldiamin; Sigma (München): Benzamidin.

Alle anderen hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden in p.a. oder vergleichbarer Qualität von den Firmen Fluka (Neu-Ulm), Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Sigma (München) und Serva (Heidelberg) bezogen.

3.6 Sonstige Materialien

Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie: Clontech (Heidelberg): TALON™ Superflow Resin.

RP-HPLC: Macherey Nagel (Düren): SP250/21 Nucleosil 100-7 C18 (7 mm, 100 Å, 21 x 250 mm); Phenomenex (Aschaffenburg): Jupiter C₁₈ (5 mm, 300 Å, 1.5 x 250 mm).

Verschiedenes: Roth (Karlsruhe): Spectra/Por-Dialysesschläuche mit 1000 Da und 3500 Da Molekulargewicht-Ausschlußgrenze; Sartorius (Göttingen): Minisart Sterilfilter (0,2 µm).

Zum Erstellen von Restriktionskarten und für die Berechnung des Molekulargewichts von Proteinfragmenten und Fusionsproteinen wurden Programme des Wisconsin Packages verwendet (Genetic Computer Group Inc., GCG, Version 1998, Madison, USA).

4. Methoden

4.1 Bestimmung der Bakteriendichte

Streulichtmessungen wurden im sichtbaren Bereich mit einem Uvikon 930 Zweistrahl-Spektralphotometer (Kontron, Eching) unter Verwendung von Polystyrol-Halbmikroküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm (Roth, Karlsruhe) durchgeführt.

Zur Bestimmung der Bakteriendichte in Nährlösungen wurde die optische Dichte der Suspension bei 600 nm (OD_{600}) gemessen, wobei die jeweilige Nährlösung als Referenz diente. Dabei entspricht eine OD_{600} von eins etwa einer Zelldichte von 1×10^9 Zellen/ml. Bei OD_{600} -Werten größer als 0,6 wurde die Bakteriensuspension mit der Nährlösung entsprechend verdünnt.

4.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Zur Konzentrationsbestimmung von Proteinen in Lösung wurde der *BCA Protein Assay Kit* (Pierce, Rockford, USA) verwendet.

Diese Methode kombiniert den Biuret-Assay mit Bichinchoninsäure (BCA) als Detektionssystem (Smith *et al.*, 1985). Die Peptidbindung, aber auch Cystein, Cystin, Tyrosin und Tryptophan können in alkalischer Lösung Cu^{2+} - zu Cu^{+} -Ionen reduzieren, welche spezifisch mit BCA zu einem farbigen Komplex reagieren. Dies ermöglicht einen sensitiven, kalorimetrischen Nachweis von Proteinen bei einer Wellenlänge von 562 nm. Die Intensität der Farbstoffbildung hängt unter anderem von der Temperatur ab, so daß die Sensitivität über diese variiert werden kann.

Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Für die Absorptionsmessungen stand ein Microplate Reader (Model 550, Biorad, München) zu Verfügung, der Messungen bei 570 nm erlaubte. Als Referenz wurde Rinderserumalbumin (BSA) verwendet.

4.3 Elektrophoretische Verfahren

4.3.1 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese wurde zur Kontrolle von Restriktionsreaktionen (Kapitel 4.7.1) und von Plasmid-DNA-Präparationen (Kapitel 4.5) sowie zur Gewinnung von DNA-Fragmenten einer bestimmten Größe (Kapitel 4.6.3) verwendet. In Abhängigkeit von

Volumen und Anzahl der Proben wurden Gele der Größe 15 cm x 15 cm in einer DNA-Sub-Cell-Gelkammer (Biorad, München) oder der Größe 10 cm x 6 cm in einer Mini-DNA-Sub-Cell-Gelkammer (Biorad, München) gegossen. Agarose wurde in Konzentrationen von 0,8 % (w/v) und 1,5 % (w/v) in TBE-Puffer (90 mM Tris, 2 mM EDTA, 90 mM H₃BO₃, pH 8,0) durch Aufkochen gelöst, und pro 100 ml Lösung wurden 5 µl 1 %ige Ethidiumbromid-Lösung zugegeben. Die Agaroselösung wurde bei 60 °C aufbewahrt.

Die Proben wurden mit 1/5 Volumen Auftragspuffer (50 mM EDTA, 50 % (v/v) Glycerin, 0,15 % (w/v) Bromphenolblau, 0,15 % (w/v) Xylencyanol) versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Als Längenstandards diente *Hind*III verdaute DNA des Bakteriophagen λ (Fragmentgrößen: 23,13 kb; 9,415 kb; 6,557 kb; 4,631 kb; 2,322 kb; 2,027 kb; 0,564 kb; 0,125 kb) bzw. *Msp*I verdaute pUC19-DNA (Kapitel 3.5). Anoden- und Kathodenraum wurden mit TBE-Puffer befüllt.

Die Elektrophorese wurde bei konstant 90 V (15 cm x 15 cm) bzw. 80 V (10 cm x 6 cm) mit einem PowerPac 300- oder 3000-Netzgerät (Biorad, München) für 30-60 min durchgeführt. Die DNA-Banden wurden durch Fluoreszenz auf einem Transilluminator sichtbar gemacht und mit einem Geldokumentationssystem (GEL DOC 2000, Biorad, München) festgehalten.

4.3.2 SDS-Gelelektrophorese

Zur analytischen Trennung von Proteingemischen und zur Reinheitskontrolle von Proteinpräparationen wurde die denaturierende Elektrophorese mit Polyacrylamid-Gelen in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat (SDS) im diskontinuierlichen System nach Laemmli (1970; M: 10-100 kDa) verwendet.

Es wurden 19 %ige SDS-Gele mit 10 cm Breite, 8 cm Höhe und 0,75 mm Dicke gegossen, wobei die Höhe des Trenngels etwa 6 cm und die des Sammelgels etwa 2 cm betrug. Die Elektrophoresen wurden in Mighty Small Gelelektrophoresekammern (Hoefer/Pharmacia, Freiburg) mit einem PowerPac 300- oder 3000-Netzgerät (Biorad, München) durchgeführt.

Nach der Färbung wurden die erreichte Auftrennung mit einem Geldokumentationssystem (GEL DOC 2000, Biorad, München) festgehalten.

19 %ige SDS-Gele nach Laemmli

Das Trenngel bestand aus 19 % (w/v) Acrylamid, 0,46 % (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid, 0,1 % (w/v) SDS und 375 mM Tris/HCl, pH 8,8. Das Sammelgel bestand aus 7,5 % (w/v)

Acrylamid, 0,21 % (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid, 0,1 % (w/v) SDS und 62 mM Tris/HCl, pH 6,8.

Die Polymerisation wurde durch Zugabe von 13 µl TEMED und 200 µl 10 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfatlösung pro 20 ml Gellösung gestartet.

SDS-Laufpuffer

Die Elektrophorese erfolgte in einem Laufpuffer mit 50 mM Tris/HCl, pH 8,3, 385 mM Glycin und 0,1 % (w/v) SDS bei einer konstanten Stromstärke von 26 mA.

Probenvorbereitung

Die zu analysierenden Proteinlösungen wurden mit dem gleichen Volumen Probenpuffer (4 x Roti-Load® (Roth, Karlsruhe), 1:1 mit Wasser verdünnt) versetzt und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Die Auftragsvolumina lagen in Abhängigkeit der Konzentration der Proteinlösung zwischen 5 µl und 20 µl.

Zellpellets wurden in 50 µl Probenpuffer resuspendiert, bei 95 °C für mindestens 10 min denaturiert und 10 µl in eine Geltasche pipettiert.

Coomassie-Blau-Färbung

Zum Sichtbarmachen der Proteinbanden wurden die SDS-Gele unmittelbar nach der Elektrophorese 30 min in Färbelösung (0,05 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250, 45 % (v/v) Methanol, 9,2 % (v/v) Essigsäure), anschließend 30 min in Entfärbelösung I (25 % (v/v) Methanol, 1 % (v/v) Essigsäure) und bis zum vollständigen Entfärben des Gelhintergrundes in Entfärbelösung II (5 % (v/v) Methanol, 7 % (v/v) Essigsäure) bei 30 rpm geschüttelt.

4.3.3 Kapillarzonelektrophorese

Zur Reinheitskontrolle nach der Proteinpräparation wurden Elektropherogramme mit einer Biofocus 3000-Anlage (Biorad, München) aufgenommen (Dr. Axel Schulz, IPF PharmaCeuticals, Hannover).

Die Kapillare (BioCap, LPA, Coated Capillary, Biorad) hatte eine Länge von 40 cm und einen Innendurchmesser von 50 µm. Die Messungen wurden bei konstant 250 µA für 30 min bei einer Detektionswellenlänge von 220 nm durchgeführt.

4.4 Zentrifugationen

Zentrifugationen wurden in Abhängigkeit von Volumen, Geschwindigkeit und Temperatur in folgenden Zentrifugen durchgeführt:

Tischzentrifuge Biofuge fresco (Heraeus, Hanau) für Probenvolumina bis 2,0 ml unter Kühlung bis max. 13000 rpm; Tischzentrifuge Biofuge stratos (Heraeus, Hanau) für Probenvolumina bis 30 ml unter Kühlung bis max. 15000 rpm; Kühlzentrifuge Centrikon T-124 (Kontron, Eching) für Probenvolumina bis 400 ml mit einem A 6.9 Rotor bei 6000 rpm unter Kühlung; Analytische Ultrazentrifuge XL-I (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA).

4.5 Isolierung von Plasmid-DNA

Zur Isolierung von Plasmid-DNA wurde ein auf Anionenaustauschchromatographie basierendes Kit von Macherey-Nagel (NucleoSpin® Plus, Macherey-Nagel, Düren) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Anweisungen des Herstellers (Macherey-Nagel, Düren). Die getrocknete DNA wurde in 100 µl sterilem Wasser aufgenommen und bei -20 °C aufbewahrt. Zum Reinheitsnachweis wurden 5 µl der Lösung mittels Agarosegelelektrophorese (Kapitel 4.3.1) untersucht. Die gereinigte Plasmid-DNA konnte für Restriktionsreaktionen (Kapitel 4.7.1), zur Sequenzierung (Kapitel 4.7.4) und für Transformationen (Kapitel 4.9) eingesetzt werden.

4.6 Fällung und Reinigung von DNA

4.6.1 Butanolpräzipitation

Die Präzipitation von DNA aus Ligationsansätzen erfolgte durch Butanol (Thomas, 1994). Dem jeweiligen Ansatz wurde das zehnfache Volumen n-Butanol zugegeben und so lange stark geschüttelt, bis keine Phasentrennung mehr sichtbar war. Die DNA wurde durch Zentrifugation (20 min, 13000 rpm, 4 °C) präzipitiert, der Überstand verworfen und das DNA-Pellet für eine Stunde bei 37 °C getrocknet. Nach Aufnahme in 10 µl sterilem Wasser konnte die DNA direkt für eine Elektrottransformation eingesetzt werden (Kapitel 4.9.2).

4.6.2 Reinigung über Silikagelmembranen

Salze und DNA-modifizierende Enzyme konnten durch die Verwendung von Säulen mit Silikagelmembran (*QIAquick spin columns*, QIAGEN, Hilden) aus der DNA-Lösung entfernt werden. Die Reinigung erfolgte nach Herstellerangaben (QIAGEN, Hilden). Abhängig von der weiteren Verwendung erfolgte die Elution gegebenenfalls mit 40-50 µl des entsprechenden Reaktionspuffers.

4.6.3 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Gewinnung von PCR- oder Restriktionsprodukten wurde der entsprechende Ansatz einer präparativen Agarosegelelektrophorese (1,5 % Agarose) unterzogen (Kapitel 4.3.1). Das DNA-Fragment der gewünschten Größe wurde ausgeschnitten und die DNA mit Hilfe des *QIAquick Gel Extraction Kit* (bis 10 µg DNA; QIAGEN, Hilden) zurückgewonnen. Die Reinigung erfolgte nach Herstellerangaben (QIAGEN, Hilden). 5 µl der gereinigten DNA wurden auf einem Agarosegel analysiert.

4.7 Enzymatische Behandlung von DNA

4.7.1 Restriktion

Für den Verdau von DNA wurden ausschließlich Restriktionsendonukleasen vom Typ II verwendet. Die jeweilige DNA-Lösung (0,1-0,5 µg DNA/µl) wurde mit den vom Hersteller empfohlenen Mengen Puffer (incl. BSA) und 1 bis 5 U Enzym pro µg DNA versetzt. Die Inkubation erfolgte für 3 h bei 37 °C (Brutschrank, Typ BE 200, Memmert, Schwabach). Die gleichzeitige Restriktion der DNA mit unterschiedlichen Enzymen war möglich, da diese bei gleichen Pufferbedingungen aktiv waren. Im Anschluß an alle Restriktionen wurde die DNA über Silikagelmembranen gereinigt (Kapitel 4.6.2) und die Vollständigkeit der Reaktion durch Agarosegelelektrophorese (Kapitel 4.3.1) überprüft.

4.7.2 Dephosphorylierung von 5'-Enden

Um die Religationsraten der Vektoren möglichst niedrig zu halten, wurden die 5'-Phosphatgruppen durch Zugabe von 1 U alkalischer Phosphatase (*shrimp alkaline phosphatase* (SAP), Roche, Mannheim) pro µg Vektor-DNA in Dephosphorylierungspuffer (10 x SAP-Puffer, Roche, Mannheim) abgespalten. Nach Inkubation für zwei Stunden bei

37 °C wurde die Reaktion durch Hitzeinaktivierung (15 min, 65 °C) beendet und Puffer, sowie Enzym mittels *QIAquick* Spinsäule (Kapitel 4.6.2) abgetrennt.

4.7.3 Ligation

Etwa 50-100 ng doppelt verdaute, dephosphorylierte Vektor-DNA wurde im molaren Verhältnis von 1:2 mit doppelt verdaulichem Insert in T4-DNA-Ligasepuffer mit T4-DNA-Ligase bei Raumtemperatur für 2 h inkubiert. Die ligierte DNA wurde durch Butanolfällung (Kapitel 4.6.1) präzipitiert und direkt für eine Elektroporation (Kapitel 4.9.2) eingesetzt.

4.7.4 Sequenzierung

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA wurde von der Firma TOPLAB/MediGenomix (Martinsried) oder AGOWA (Berlin) durch Cycle-Sequenzierung mit fluoreszenzmarkierten ddNTPs als Kettenterminatoren auf einem ABI-System durchgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der ABI-Prism-Software.

4.8 Anwendungen der Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) eignet sich zur selektiven, enzymatischen Amplifikation von DNA-Fragmenten *in vitro* (Saiki *et al.*, 1985). In der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode zur Anreicherung von Insert-DNA, selektiver Mutagenese und Identifizierung positiver Transformanten bei Klonierungsexperimenten verwendet.

Die Durchführung erfolgte mit einem GeneAmp PCR 2400 System von Perkin Elmer (Norwalk, USA).

4.8.1 Kolonie-PCR

Mit Hilfe der Kolonie-PCR konnten Transformanten-Kolonien ohne eine Plasmidisolierung auf eine erfolgreiche Klonierung hin überprüft werden. Die Bakterien dienten dabei als DNA-Lieferant für die PCR. Als Primer wurden zu den 5'- und 3'-Enden des klonierten DNA-Fragments komplementäre Oligonukleotide eingesetzt.

In einem PCR-Reaktionsgefäß wurden jeweils 1 µM der beiden Primer, 200 µM jeden dNTPs in 10 mM (NH₄)₂SO₄, 4 mM MgCl₂, 10 mM Tris/HCl, pH 8,8, 50 mM NaCl, 0,08 % Nonidet P-40, 0,2 mg BSA/ml vorgelegt. Anschließend wurden 0,5 U *Taq*-DNA-Polymerase pro 50 µl

Ansatz auf Eis zugegeben. Mit einem sterilen Zahnstocher wurde vorsichtig eine gut separierte Transformanten-Kolonie von der Agarplatte abgenommen und in den PCR-Ansatz eingetaucht. Anschließend wurde der Zahnstocher in 5 ml steriles LB-Selektivmedium überführt und bei 37 °C inkubiert.

Der PCR-Ansatz wurde für 5 min bei 95 °C denaturiert. Es folgten 35 Zyklen mit je 30 s Denaturierung bei 95 °C, 20 s Primer-Hybridisierung bei 50 °C und 40 s Primer-Verlängerung bei 72 °C. Der letzte Primer-Verlängerungsschritt wurde um 2 min verlängert. Die PCR-Ansätze wurden sofort mittels Agarosegelelektrophorese (Kapitel 4.3.1) auf die Anreicherung eines DNA-Fragmentes, dessen Größe dem klonierten Fragment entsprach, untersucht. Falls das Ergebnis der Kolonie-PCR positiv war, wurde die entsprechende Flüssigkultur über Nacht bei 37 °C inkubiert und für eine Plasmidisolierung (Kapitel 4.5) verwendet.

4.8.2 PCR mit Linker-Primern

Die flankierenden Bereiche von DNA-Fragmenten wurden durch PCR mit Linker-Primern verändert, um geeignete Restriktions- sowie Proteinaseschnittstellen einzuführen.

Die verwendeten Primer besaßen einen zur Matrize komplementären 3'-Bereich von mindestens 21 Nukleotiden, um eine stringente Hybridisierung zu gewährleisten. Im 5'-Bereich der Primer wurden die benötigten Restriktions- und Proteinaseschnittstellen eingeführt. In einem PCR-Reaktionsgefäß wurden 100 µl mit 50-100 ng Plasmid-DNA, je 1 µM der beiden Primer, 200 µM jeden dNTPs in 10 mM (NH₄)₂SO₄, 20 mM Tris/HCl, pH 8,8, 10 mM KCl, 0,1 % Triton X-100 und 2 mM MgSO₄ vorgelegt. Unmittelbar nach Zugabe von 2 U *Vent*-DNA-Polymerase wurde der Ansatz bei 95 °C für 5 min denaturiert. Es folgten 35 Zyklen mit 30 s Denaturierung bei 95 °C, 20 s Primer-Hybridisierung bei 50 °C und Primer-Verlängerung bei 72 °C über einen Zeitraum von 6-10 s pro 100 bp.

Der gesamte Reaktionsansatz wurde auf ein präparatives Agarosegel aufgetragen und das amplifizierte DNA-Fragment durch Gelextraktion (Kapitel 4.6.3) gewonnen.

4.8.3 *splicing-by-overlap-extension*-PCR-Mutagenese

Diese Methode ermöglicht durch zwei aufeinanderfolgende PCR-Schritte den Austausch einzelner Basen aber auch größerer Abschnitte in inneren Bereichen eines Gens, die nicht durch Linker-Primer abgedeckt werden können (Ho *et al.*, 1989). Für die Durchführung werden 4 unterschiedliche Primer benötigt, die komplementär zum 5'- bzw. 3'-Ende des Gens

sein müssen (Abb. 4.1; Primer 1 und 2), sowie zwei die gewünschte Mutation enthaltene, zueinander komplementäre oder teilweise komplementäre Primer (Abb. 4.1; Primer 3 und 4). Im ersten PCR-Schritt werden mit Hilfe der Primer 1 und 3, bzw. 2 und 4 die zwei Bereiche stromaufwärts und stromabwärts der gewünschten Mutation amplifiziert (Abb. 4.1, Schritt 1), die Fragmente mittels Agarosegelelektrophorese analysiert (Kapitel 4.3.1), extrahiert (Kapitel 4.6.3) und für die zweite PCR eingesetzt. Nach Hybridisierung der beiden Fragmente über die komplementären Bereiche (entspricht Primern 3 und 4 oder Teilen von beiden) und Komplementärstrangsynthese (Abb. 4.1, Schritt 2) erfolgt die Amplifikation des mutierten Gens durch Zugabe der endständigen Primer 1 und 2 (Abb. 4.1, Schritt 2).

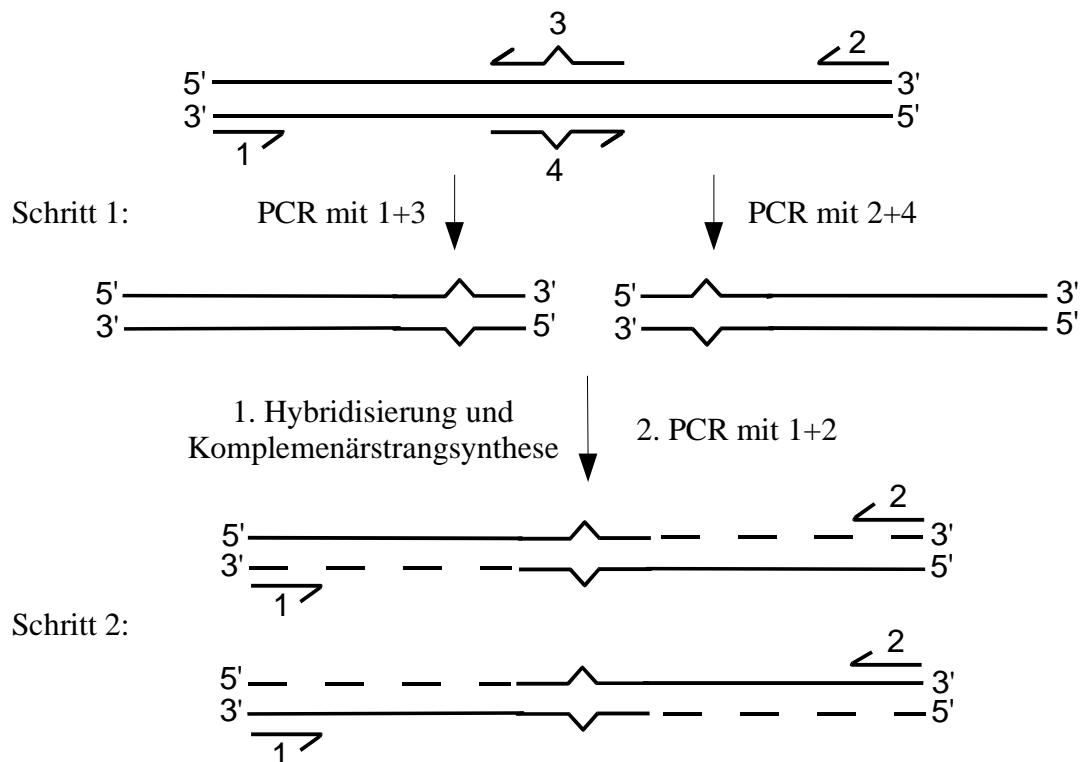


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung der Mutagenese mittels *splicing-by-overlap-extension* (Ho *et al.*, 1989). Schritt 1 umfaßt zwei PCR-Reaktionen mit den jeweils angegebenen Primern. Im 2. Schritt erfolgt zunächst die Hybridisierung komplementärer Bereiche (entsprechend Primer 3 und 4 bzw. Teilbereichen beider Primer) gefolgt von der Synthese der jeweils komplementären Stränge (gestrichelte Linie). Der abschließende PCR-Schritt (Primer 1 und 2) amplifiziert ausschließlich die mutierte DNA. Die DNA ist jeweils als durchgezogene Linie unter Angabe von 5'- und 3'-Ende der einzelnen Stränge dargestellt, die 3'-Enden der Primer (1-4) sind als Halbpfeile und die gewünschte Mutation als dreieckige Ausbauchung angedeutet.

Schritt 1: Die PCR-Reaktionsansätze wurden wie in Kapitel 4.8.2 beschrieben vorgelegt und die Reaktionen wie folgt durchgeführt: 5 min Denaturierung bei 95 °C; 35 Zyklen mit je 30 s Denaturierung bei 95 °C, 20 s Primer-Hybridisierung bei 50 °C und 18 s (Proguanylin) bzw. 35 s (miniGC-C) Primer-Verlängerung bei 72 °C. Der letzte Primer-Verlängerungsschritt wurde um 2 min ausgedehnt.

Schritt 2: Die PCR-Reaktionsansätze wurden wie in Kapitel 4.8.2 beschrieben vorgelegt, jedoch wurden keine Primer eingesetzt und anstelle der Plasmid-DNA die aus Schritt 1 erhaltenen PCR-Fragmente (im molaren Verhältnis von 1:1, jeweils etwa 10 µl) verwendet. Die Reaktionen wurden wie folgt durchgeführt: 5 min Denaturierung bei 95 °C; 10 Zyklen mit je 30 s Denaturierung bei 95 °C, 20 s Hybridisierung komplementärer Bereiche bei 50 °C und 18 s (Proguanylin) bzw. 35 s (miniGC-C) Komplementärstrangsynthese bei 72 °C. Nach Zugabe von je 1 µM der Primer 1 und 2 wurde die Reaktion wie folgt weitergeführt: 5 min Denaturierung bei 95 °C; 35 Zyklen mit je 30 s Denaturierung bei 95 °C, 20 s Primer-Hybridisierung bei 50 °C und 25 s (Proguanylin) bzw. 45 s (miniGC-C) Primer-Verlängerung bei 72 °C. Der letzte Primer-Verlängerungsschritt wurde um 2 min ausgedehnt.

4.8.4 QuickChange-PCR-Mutagenese

Diese Methode ermöglicht einen schnellen Austausch einzelner Basen in einem beliebigen Bereich eines Gens. Mit geeigneten Mutageneseprimern wird dabei die gesamte, das betroffene Gen enthaltene Plasmid-DNA amplifiziert. Bei Verwendung von *Dam*-methylierter Matrizen-DNA kann diese anschließend durch die Restriktionsendonuklease *DpnI* abgebaut werden, während die neu synthetisierte DNA aufgrund fehlender Methylierung erhalten bleibt und für eine Transformation eingesetzt werden kann.

Für den gezielten Basenaustausch mittels *QuickChange*-Mutagenese wurde ein Kit von Stratagene (*QuickChange® Multi Site-directed Mutagenesis Kit*) verwendet, welches nur einen einzigen 5'-phosphorylierten Mutageneseprimer benötigt. Die entstandene einzelsträngige DNA wird durch eine DNA-Polymerase mit fusionierter Ligase-Aktivität ligiert. Nach Transformation (Kapitel 4.9.1) erfolgt die Komplementärstrangsynthese in den Bakterienzellen (*E. coli* Top10; Kapitel 3.1.1). Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben (Stratagene, La Jolla, USA).

4.9 Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA

Für die Übertragung von Plasmid-DNA in Bakterienzellen wurden sowohl die CaCl_2 -Methode (Cohen *et al.*, 1972), als auch die Elektroporation (Dower *et al.*, 1988) eingesetzt. War eine hohe Transformationseffizienz nötig, wie bei der Übertragung von DNA aus Ligationsansätzen, wurden die Bakterienzellen einer Elektrotransformation unterzogen. Bei der Übertragung eines Plasmids auf einen anderen Bakterienstamm war die CaCl_2 -Methode ausreichend.

4.9.1 CaCl_2 -Transformation

Herstellung normalkompetenter Zellen

50 ml LB-Medium wurden mit einer Übernachtskultur (ÜNK) auf eine OD_{600} von 0,1 inokuliert und bei 37 °C inkubiert. Bei einer OD_{600} von 0,6 bis 0,8 wurden die Zellen durch Zentrifugation (5000 rpm, 5 min, 4 °C) geerntet, in 45 ml steriler, eiskalter CaCl_2 -Lösung (50 mM CaCl_2 , 10 mM RbCl , 15 % (v/v) Glycerin, 10 mM Tris/HCl, pH 8,0) resuspendiert und für mindestens eine Stunde auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Zellpellet in 2 ml steriler, eiskalter CaCl_2 -Lösung aufgenommen und in 50 µl-Portionen aufgeteilt. Die Zellen konnten direkt für eine Transformation eingesetzt oder bei -80 °C aufbewahrt werden.

CaCl_2 -Methode (modifiziert nach Hanahan, 1983)

50 µl der kompetenten Zellen wurden mit 50-100 ng Plasmid-DNA in 3-5 µl Wasser gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem einminütigen Hitzeschock bei 42 °C und weiteren 10 min auf Eis erfolgte die Zugabe von 1 ml sterilem LB-Medium. Der Ansatz wurde für eine Stunde bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt (Certomat HK und Certomat R, Braun, Melsungen) und anschließend 200 µl und 50 µl der transformierten Zellen direkt auf LB-Selektivmedium ausplattiert. Die restliche Zellsuspension wurde durch Zentrifugation (5 min, 13000 rpm, 4 °C) pelletiert, in etwa 200 µl LB resuspendiert und ebenfalls ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C im Brutschrank (Typ BE 200, Memmert, Schwabach) inkubiert.

4.9.2 Elektrotransformation

Herstellung elektrokompeter Zellen

Für die Herstellung elektrokompeter Zellen wurde 1 l LB-Medium mit einer ÜNK auf eine OD₆₀₀ von 0,1 inokuliert und bei 37 °C geschüttelt (200 rpm). Bei einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,7 wurden die Zellen in vorgekühlten Zentrifugenbechern (4000 rpm, 15 min, 4 °C) geerntet und im weiteren Verlauf immer auf Eis gehalten. Nach Aufnahme der Zellen in zunächst 1 l, dann 500 ml und 250 ml Glycerinlösung (10 % (v/v) Glycerin) folgten weitere Zentrifugationen. Das Zellpellet wurde in 3 ml Glycerinlösung resuspendiert (ca. 1×10^{10} Zellen/ml) und in 60 µl-Portionen aufgeteilt. Die Zellen konnten direkt für eine Elektroporation eingesetzt oder bei -80 °C aufbewahrt werden.

Elektroporation

Etwa 5-10 ng Plasmid-DNA in 3 µl Wasser wurden in vorgekühlten Elektroporationsküvetten (0,1 cm, BioRad, München) vorgelegt, mit 60 µl elektrokompenten Zellen gemischt und 2 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Küvette in den vorgekühlten Schlitten des Elektroporators (*E. coli* Pulser, BioRad, München) eingesetzt und in die Schockkammer eingeführt. Der Puls erfolgte mit 1,8 kV. Die Bakteriensuspension wurde sofort mit 1 ml sterilem LB-Medium vermischt, in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und für 90 min bei 37 °C geschüttelt (200 rpm). Danach wurden die Zellen, wie bei der CaCl₂-Transformation beschrieben, auf LB-Selektivmedium ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

4.10 Anzucht von Bakterien

Übernachtskulturen

5-20 ml LB- oder M9-Medium mit den erforderlichen Antibiotika (Ampicillin: 100 µg/ml; Kanamycin (bei *E. coli* AD494(DE3) und Origami(DE3)): 15 µg/ml; Tetracyclin (bei *E. coli* Origami(DE3)): 12,5 µg/ml) wurden entweder mit einer gut separierten Bakterienkolonie oder mit 50 µl (bei LB-Medium) bzw. 300 µl (bei M9-Medium) einer Dauerkultur inokuliert. Die Kultur wurde über Nacht bei 37 °C und 200 rpm inkubiert.

Dauerkulturen

Dauerkulturen wurden durch Mischen von 850 µl einer LB-ÜNK mit 150 µl sterilem Glycerin (87 % (v/v)) hergestellt. Die Kulturen wurden bei -80 °C aufbewahrt.

4.11 Expression von Fusionsproteinen

4.11.1 Untersuchung auf Überexpression

Um festzustellen, ob nach Induktion mit IPTG das gewünschte Genprodukt überexprimiert wird, wurden Expressionsversuche durchgeführt. Außerdem dienten sie zur Bestätigung der Überexpression beim Wachstum der Expressionsstämme auf Minimalmedium, um festzustellen, ob eine Isotopenmarkierung mit ^{15}N bzw. $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ zur Durchführung heteronuklearer NMR-Experimente möglich ist.

50 ml LB- oder M9-Selektivmedium wurden mit einer ÜNK des zu testenden Stammes auf eine OD_{600} von 0,1 (LB-Medium) bzw. 0,3 (M9-Medium) inokuliert und bei 37 °C unter Schütteln (200 rpm) inkubiert. Bei einer OD_{600} von etwa 0,8 (LB) bzw. 0,9 (M9) wurde mit IPTG (Endkonzentration 1 mM) induziert. Unmittelbar vor und stündlich nach Induktion wurde ein Aliquot entnommen, das einer OD_{600} von 1,0 entsprach. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (1 min, 13000 rpm, 4 °C) sedimentiert und bis zur elektrophoretischen Analyse (Kapitel 4.3.2) bei -20 °C aufbewahrt.

4.11.2 Schüttelkulturen

Zur Gewinnung rekombinanter Proteine wurden die Expressionsstämme in Schüttelkolben mit Schikanen angezogen. 50-250 ml LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika wurden direkt mit 50-200 µl einer Dauerkultur beimpft und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Um Zellen in M9-Medium anzuziehen, wurden 30 ml Selektivmedium mit einer kompletten ÜNK (20 ml) beimpft und über Nacht geschüttelt (37 °C, 200 rpm). Anschließend wurden nacheinander 150 und 200 ml M9-Medium zugegeben und jeweils erneut über Nacht inkubiert.

Bis zu 3 x 1,5 l des entsprechenden Mediums in 5 l Erlenmeyerkolben (mit Schikanen) wurden mit diesen Vorkulturen auf eine OD_{600} von 0,1 (LB) bzw. 0,3 (M9) inokuliert und bei 37 °C und 180 rpm geschüttelt. Die Induktion erfolgte bei einer OD_{600} von 0,8 (LB) bzw. 0,9 (M9) durch Zugabe von IPTG zu einer Endkonzentration von 1 mM. Unmittelbar nach Induktion erfolgte die weitere Inkubation bei 30 °C bzw. 25 °C (bei Proguanylin-C48S/C61S)

und 180 rpm. Direkt vor und am Ende der Induktion wurde ein Aliquot entnommen, das einer OD₆₀₀ von 1,0 entsprach. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (1 min, 13000 rpm, 4 °C) sedimentiert und bis zur elektrophoretischen Analyse (Kapitel 4.3.2) bei -20 °C aufbewahrt.

Vier bis 16 Stunden nach Induktion wurden die Zellen durch Zentrifugation (15 min, 6000 rpm, 4 °C) geerntet und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

4.12 Reinigung von Fusionsproteinen

Die in dieser Arbeit verwendeten Fusionsproteine besitzen NH₂-terminale Fusionspartner mit 6 aufeinanderfolgenden Histidinresten (*His₆-tag*). Die hohe Affinität der Imidazol-Seitenkette von Histidin zu Metallionen wie Ni²⁺ oder Co²⁺ ermöglicht die Reinigung der Fusionsproteine über an einer Sepharose-Matrix immobilisierte Co²⁺-Ionen (TALON™ Superflow Resin, Clontech, Heidelberg). Durch die lokal hohe Konzentration der Histidinreste werden die Proteine an das Säulenmaterial gebunden. Zelluläre Proteine werden nicht oder nur schwach gebunden und können mit niedrigen Konzentrationen des Kompetitors Imidazol von der TALON™-Säule verdrängt werden. Die Elution der Fusionsproteine erfolgt durch Waschen der Säule mit einem Puffer höherer Imidazolkonzentration.

4.12.1 Gewinnung zellfreier Extrakte

Die Zellen wurden in 15-20 ml Aufschlußpuffer (50 mM Tris/HCl bzw. Natrium-Phosphat, pH 8,0, 300 mM NaCl, 0,2 mg/ml Lysozym, 0,2 mg/ml DNaseI, 2 mg/ml Benzamidin, 1 Proteinaseinhibitorcocktail-Tablette pro 100 ml Puffer) pro Gramm Naßzellgewicht resuspendiert und 20 min auf Eis gerührt. Nach drei Ultraschallbehandlungen (200 Watt, Labsonic U, Nadelsonde 40T; B. Braun, Melsungen) für jeweils 15 s wurde die Lösung weitere 10 min auf Eis gerührt und für 1 h bei -80 °C tiefgefroren. Nach dem Auftauen wurden die drei Ultraschallbehandlungen wiederholt und das Lysat bei 13000 rpm (35 min, 4 °C) zentrifugiert, um Zelltrümmer zu entfernen.

4.12.2 Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie

Zur Reinigung der Fusionsproteine wurde eine Affinitätschromatographie mit immobilisierten Co²⁺-Ionen durchgeführt (Porath, 1992). Für die Durchführung der Chromatographie wurde eine XK16-Säule (Pharmacia, Freiburg) mit 15 ml Säulenmaterial (TALON™ Superflow

Resin, Clontech, Heidelberg) an einem ÄKTA *purifier* (Pharmacia, Freiburg) verwendet. Zunächst wurde die Säule mit dem dreifachen Bettvolumen (3 x Vol) Wasser gewaschen und anschließend mit ebenfalls 3 x Vol Auftragspuffer äquilibriert (Flußrate: je 2 ml/min). Nach Probenauftrag (Flußrate: 1-1,5 ml/min) wurde die Säule mit 6 x Vol Auftragspuffer gewaschen, um unspezifisch gebundene zelluläre Proteine von der Säule zu verdrängen (Flußrate: 2 ml/min). Die Elution der Fusionsproteine erfolgte mit einem Imidazol-Stufengradienten (4 x Vol 4 %, 4 x Vol 10 %, 2 x Vol 20 % und 1 x Vol 100 % Elutionspuffer). Zur elektrophoretischen Analyse (Kapitel 4.3.2) der proteinhaltigen Fraktionen wurden jeweils 50 µl Aliquote entnommen. Zur Regeneration wurde die Säule mit 4 x Vol MES-Puffer und anschließend mit 6 x Vol Wasser gewaschen und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert. Sollte eine Lagerung über einen langen Zeitraum erfolgen, wurde die Säule zusätzlich mit 4 x Vol 25 % (v/v) Ethanol gewaschen, um mikrobiellen Befall zu verhindern.

Puffer

Auftragspuffer:	50 mM Natrium-Phosphat, 300 mM NaCl, pH 8,0
Elutionspuffer:	50 mM Natrium-Phosphat, 300 mM NaCl, 1 M Imidazol, pH 8,0
MES-Puffer:	20 mM MES, 100 mM NaCl, pH 5,0

Sollte anschließend eine Spaltung der Fusionsproteine mit Enterokinase oder Faktor Xa erfolgen, wurde bei Auftrags- und Elutionspuffer Tris/HCl anstelle von Natrium-Phosphat verwendet.

4.13 Entfernen des Fusionspartners

4.13.1 Behandlung der Fusionsproteine mit Proteinasen

Die Spaltung der Fusionsproteine erfolgte direkt nach deren Elution in Lösung. Um nach Proteinase-Behandlung eine erneute Bindung des Thioredoxin/Histidin-Anhangs an die TALON™-Säule zu erlauben, wurden die Eluate für mindestens 6 h bei 4 °C gegen Spaltpuffer (ohne CaCl₂ bei anschließender Behandlung mit Enterokinase oder Faktor Xa) dialysiert. Dadurch wurden gleichzeitig die für die Aktivität der Proteinase Enterokinase und Faktor Xa hohen inhibitorischen NaCl- und Imidazolkonzentrationen verringert.

Spaltung mit Enterokinase

Die dialysierte Proteinlösung wurde mit der entsprechenden Menge CaCl_2 (2mM Endkonzentration) versetzt und durch Zugabe von 1 U Enterokinase pro mg Fusionsprotein gespalten (Raumtemperatur (RT), 16 h). Die Spaltung wurde durch Zugabe von PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid (Merck, Darmstadt); Endkonzentration 1 mM) beendet.

Spaltung mit Faktor Xa

Die dialysierte Proteinlösung wurde mit der entsprechenden Menge CaCl_2 (5 mM Endkonzentration) versetzt und durch Zugabe von 5 U Faktor Xa pro mg Fusionsprotein gespalten (RT, 15 h). Die Spaltung wurde durch Zugabe von PMSF (Endkonzentration 1 mM) beendet.

Spaltung mit PreScission

Die dialysierte Proteinlösung wurde durch Zugabe von 8 U PreScission pro mg Fusionsprotein gespalten (4 °C, 15 h). Auf eine Inaktivierung der Proteinase wurde verzichtet, da diese nicht durch einfache Bedingungen erreicht werden kann (*Certificate of Analysis*, PreScission™ Protease, Pharmacia, Freiburg).

Puffer

Enterokinase-Spaltpuffer: 50 mM Tris/HCl, pH 7,0, 50 mM NaCl, 2 mM CaCl_2

Faktor Xa-Spaltpuffer: 50 mM Tris/HCl, pH 8,0, 100 mM NaCl, 5 mM CaCl_2

PreScission-Spaltpuffer: 50 mM Natrium-Phosphat, 150 mM NaCl, pH 8,0

4.13.2 Isolierung des Proteins ohne Fusionspartner

Nach beendeter Spaltung (Kapitel 4.13.1) wurde der Ansatz auf die in Auftragspuffer äquilibrierte (3 x Vol) TALON™-Säule aufgebracht (Flußrate: 1,5 ml/min), der Proguanylinhaltige Durchbruch gesammelt und die Säule mit 6 x Vol Auftragspuffer gewaschen (Flußrate: 2 ml/min). Thioredoxin/Histidin-Anhang, sowie ungespaltenes Fusionsprotein wurden mit 4 x Vol 10 % Elutionspuffer von der Säule verdrängt (Flußrate: 2 ml/min). Die Säule wurde wie beschrieben regeneriert (Kapitel 4.12.2). Zur elektrophoretischen Analyse (Kapitel 4.3.2) der proteinhaltigen Fraktionen wurden jeweils 50 µl Aliquote entnommen.

Durchbruch und Proguanylin-haltige Waschfraktionen wurden vereinigt, mehrmals gegen 5 l Wasser dialysiert und an einer CHRIST LOC-1M Lyophylle (B. Braun, Melsungen) zur Trockene eingengt oder direkt für eine präparative RP-HPLC (4.13.3) eingesetzt.

4.13.3 Reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC)

Für die Durchführung von analytischen Sedimentationsexperimenten (Kapitel 4.17) und NMR-Experimenten (Kapitel 4.19) wurden die Proguanylin-haltigen Fraktionen (Kapitel 4.13.2) mit konzentrierter HCl angesäuert (pH 2), mit TFA in einer Endkonzentration von 0,1 % (v/v) versetzt und über einen Lösungsmittelschlauch auf eine präparative Nucleosil C18-Säule (7 mm, 100 Å, 21 x 250 mm; Macherey & Nagel, Düren) an einem Waters Delta 600 System (Waters, Eschborn) aufgetragen. Als Lösungsmittel wurden 0,1 % TFA (Lösungsmittel A) und 0,1 % TFA in einem Acetonitril/H₂O-Gemisch (4:2, v/v; Lösungsmittel B) verwendet. Die gebundenen Proteine wurden durch einen konstanten Gradienten von 20-80 % Lösungsmittel B in 40 min eluiert (Flußrate: 10 ml/min). Noch enthaltene PreScission-Proteinase und mögliche weitere Verunreinigungen konnten so abgetrennt werden. Die Elution der Proteine wurde durch Messung der Absorption bei 220 und 280 nm beobachtet (Waters 2487 Dual Wavelength Detektor, Waters, Eschborn).

Die Peaks wurden getrennt aufgefangen (Waters Fraction Collector II, oder manuell) und je 100 µl zur elektrophoretischen Analyse (Kapitel 4.3.2) entnommen, an einer Vakuumzentrifuge (Fröbel Labortechnik, Lindau) eingengt und in 20 µl Probenpuffer (1 x Rotiload®, Roth, Karlsruhe) aufgenommen. Nach Konzentrationsbestimmung (Kapitel 4.2) wurde der Proguanylin-haltige Peak an einer CHRIST Alpha RVC Vakuumzentrifuge (B. Braun, Melsungen) zur Trockene eingengt.

Wurde zu analytischen Zwecken eine hohe Auflösung der Chromatogramme benötigt, wurde gereinigtes Proguanylin mittels analytischer RP-HPLC untersucht (Dr. Axel Schulz, IPF PharmaCeuticals, Hannover). Dazu wurde eine Jupiter C₁₈-Säule (5 mm, 300 Å, 1,5 x 250 mm; Phenomenex, Aschaffenburg) an einem HPLC-System von Kontron (Eching) verwendet. Die Läufe wurden mit einem konstanten Gradienten von 10-70 % (v/v) Lösungsmittel B in 60 min mit einer Flußrate von 0,2 ml/min durchgeführt. Die Elution der Proteine wurde durch Messung der Absorption bei 215 nm beobachtet.

4.14 Nachweis der Disulfidverbrückung von Proguanylin

Ein Nachweis der Disulfidverbrückung von Proguanylin ist mittels RP-HPLC nach der Freisetzung von biologisch aktivem Guanylin (Proguanylin Reste 80-94) möglich. Diese Freisetzung kann durch Behandlung von Proguanylin mit Essigsäure erfolgen, die zur Hydrolyse der labilen Asp79-Pro80-Bindung führt.

Essigsäure-Spaltung von Proguanylin

Geringe Mengen (ca. 50 µg) an rekombinantem und natürlichem Proguanylin wurden in 50 µl 1M HOAc gelöst und für 0, 15, 30, 45 und 60 min bei 95 °C inkubiert. Nach dem Abstoppen der Reaktion durch frieren mit flüssigem Stickstoff wurden die Proben lyophilisiert, in 50 µl H₂O (bidest) gelöst und einem cGMP-Bioassay (Kapitel 4.15), Elektrospray-Massenspektrometrie (Kapitel 4.16) und analytischer RP-HPLC (Kapitel 4.13.3) zugeführt. Die Chromatographie wurde wie in Kapitel 4.13.3 beschrieben, jedoch mit einer gekühlten Säule (11 °C) durchgeführt (Dr. Axel Schulz, IPF PharmaCeuticals, Hannover). Natürliches Proguanylin wurde von Dr. Axel Schulz (IPF PharmaCeuticals, Hannover) zur Verfügung gestellt.

4.15 Nachweis der biologischen Aktivität

Die biologische Aktivität von rekombinantem Proguanylin bzw. Proguanylin-Hydrolysat (Kapitel 4.14) wurde anhand der Produktion des intrazellulären Botenstoffes cGMP nach Stimulation von T84 Zellen untersucht (Dr. Axel Schulz, IPF PharmaCeuticals, Hannover). Von den in der Literatur bekannten Guanylatzyklasen exprimieren diese humanen Dickdarm-Karzinom-Zellen (T84) ausschließlich den Guanylin-Rezeptor GC-C (Singh *et al.*, 1991). Die Erhöhung der cGMP-Konzentration innerhalb dieser Zellen ist somit ein indirektes, aber spezifisches Maß für die Aktivierung dieses Rezeptors (Currie *et al.*, 1992).

Kultivierte T84 Zellen wurden für 45 min bei 37 °C mit gereinigten Peptiden (synthetisches Guanylin mit selektiv eingeführten Disulfidbrücken, Konzentrationen: 0,01, 0,1 und 1 µM) bzw. mit Essigsäure-behandeltem natürlichen und rekombinanten Proguanylin (Gesamtkonzentration: ca. 1 µM) inkubiert. Die Durchführung erfolgte in Gegenwart des Phosphodiesteraseinhibitors Isobutylmethylxanthin (IBMX, 1 mM, Sigma) (Kuhn *et al.*, 1993). Durch frieren in eiskaltem Ethanol (-20 °C) wurde die Reaktion abgestoppt und gleichzeitig die

Zellen lysiert. Die Menge des intrazellulär gebildeten cGMP wurde anschließend durch einen spezifischen cGMP-ELISA (IHF, Institut für Hormon- und Fortpflanzungsforschung GmbH, Hamburg) detektiert (Kaeber & Resch, 1985).

Synthetisches Guanylin wurde von Dr. Axel Schulz (IPF PharmaCeuticals, Hannover) zur Verfügung gestellt.

4.16 Massenspektrometrie

Zur Analyse des Molekulargewichts von rekombinantem Proguanylin wurden MALDI-TOF-Massenspektren auf einem Reflectron MALDI-TOF-Massenspektrometer (Voyager, Perseptive Biosystems, Houston, TX) aufgenommen (Dr. Axel Schulz, IPF PharmaCeuticals, Hannover).

Außerdem wurden Elektrospray-Massenspektren (ESI-Massenspektren) von Proguanylin- $\Delta(28-37)$, Proguanylin-C48S/C61S und Proguanylin-C86S/C94S auf einem LCT *time of flight mass spectrometer* (Micromass Limited, Wythenshawe, UK) am Lehrstuhl für Bioorganische Chemie der Universität Bayreuth aufgenommen (Ulrich Scheckenhofer, LS Biopolmere, Universität Bayreuth). Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem lehrstuhleigenen Programm ESICConverter (Ulrich Scheckenhofer).

4.17 Analytische Ultrazentrifugation

4.17.1 Theoretische Grundlagen

Die analytische Ultrazentrifugation ist eine der ältesten Methoden zur Untersuchung von Makromolekülen in Lösung und war essentiell für den Nachweis, daß Proteine tatsächlich Makromoleküle sind (Ralston, 1993). Durch eine Vielzahl von einzigartigen Eigenschaften ist die analytische Ultrazentrifugation noch immer für etliche biologische und biophysikalische Fragestellungen die Methode der Wahl. Beispielsweise können die Molekulargewichte von nativ gefalteten Molekülen in Lösung ohne Einschränkung des Molekulargewichtsbereichs abgeschätzt werden, so daß eine Untersuchung der meisten biologisch relevanten Moleküle von Zuckern bis hin zu hochmolekularen Komplexen möglich ist. Assoziierende Systeme können untersucht werden, wobei eine genaue Aussage über den Oligomerzustand eines Makromoleküls gemacht und sogar die Molekulargewichte der an der Ausbildung eines Komplexes beteiligten individuellen Moleküle sowie Größe und Stöchiometrie des

Komplexes und Stärke der Wechselwirkungen zwischen den beteiligten Komponenten im thermodynamischen Gleichgewicht bestimmt werden kann. Weiterhin enthalten die Sedimentationsdaten Information über die hydrodynamischen Eigenschaften des untersuchten Moleküls, wie zum Beispiel den Symmetriegrad oder den Diffusionskoeffizienten, so daß Konformationsänderungen, z.B. bei Ligandenbindung detektiert werden können.

In der vorliegenden Arbeit wurden Sedimentationsgleichgewichts- und Sedimentationsgeschwindigkeits-Experimente zur Untersuchung des Oligomerzustandes von natürlichem und rekombinantem Proguanylin sowie von rekombinantem Proguanylin- $\Delta(28-37)$ durchgeführt. Dabei wurden für die Datenauswertung der Sedimentationsgeschwindigkeits-Experimente differentielle Verteilungsfunktionen von Lösungen der Lamm-Gleichung ($c(s)$) verwendet (Schuck, 1998; Schuck, 2000; Schuck *et al.*, 2002). Diese empfindliche und hochauflösende Methode erlaubt eine Berücksichtigung der Diffusion während der Sedimentation und soll in den folgenden Abschnitten kurz erläutert werden.

Das Sedimentationsgleichgewichts-Experiment

Bringt man eine Lösung mit homogener Verteilung einer Komponente i in ein konstantes Zentrifugalfeld, so wird sich mit zunehmendem radialem Abstand vom Rotormittelpunkt ein ansteigender Konzentrationsgradient von i ausbilden (Abb. 4.2).

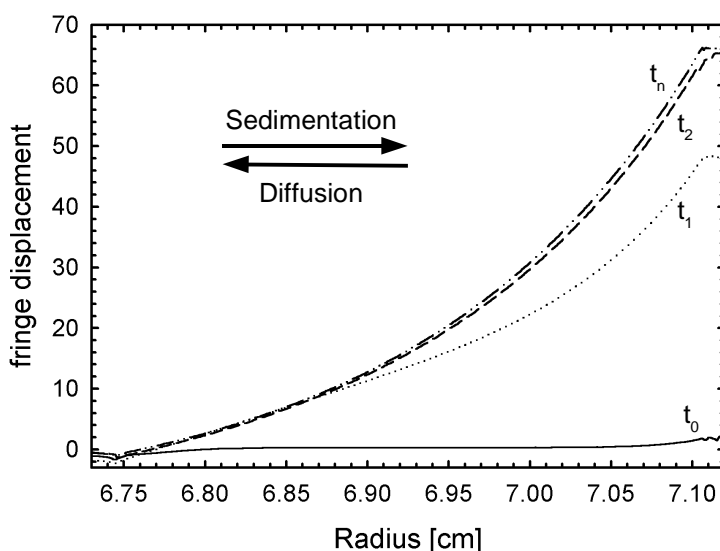


Abbildung 4.2: Schematische Darstellung des Konzentrationsgradienten einer Komponente i in einer Zentrifugenzelle zu unterschiedlichen Zeitpunkten t_0 bis t_n nach Erreichen der Rotor-Endgeschwindigkeit. Dabei entspricht t_0 der Situation zum Beginn des Experiments und t_n stellt die Gleichgewichtssituation dar. Aufgetragen ist die Verschiebung des Brechungsindex (*fringe displacement*) als Maß für die Konzentration von i gegen den Abstand vom Rotormittelpunkt. Die Netto-Wirkungsrichtung der vorherrschenden Prozesse ist mit Pfeilen angedeutet.

Thermodynamisch kann dieser Vorgang über das chemische Potential μ_i der Komponente i beschrieben werden, welches um die potentielle Energie des Gravitationsfeldes ergänzt ist. Für das resultierende Gesamtpotential $\bar{\mu}_i$ gilt dann folgende Beziehung:

$$\bar{\mu}_i = \mu_i - \frac{1}{2} M_i \omega^2 r^2 \quad (\text{Gleichung 4.1}),$$

wobei M_i das Molekulargewicht der Komponente i , ω die Winkelgeschwindigkeit des Rotors und r der Abstand vom Rotormittelpunkt ist.

Die bei diesem Experiment gegenläufig wirkenden Prozesse der Sedimentation und Diffusion werden nach einer bestimmten Zeit gerade gleich groß und es wird keine weitere radiale Änderung des Gesamtpotentials mehr beobachtet – das System befindet sich im thermodynamischen Gleichgewicht (Abb. 4.2; Zeitpunkt t_n). Aus Gleichung 4.1 folgt daher:

$$\frac{d\bar{\mu}_i}{dr} = 0 = \frac{d\mu_i}{dr} - M_i \omega^2 r \quad (\text{Gleichung 4.2}).$$

Die Änderung des chemischen Potentials μ_i der Komponente i wird durch deren partielle Ableitung bei jeweils konstantem Druck P , Temperatur T und Konzentration C beschrieben (van Holde *et al.*, 1998a; Gleichung 4.3):

$$\frac{d\mu_i}{dr} = \left(\frac{d\mu_i}{dT} \right)_{P,C} \frac{dT}{dr} + \left(\frac{d\mu_i}{dP} \right)_{T,C} \frac{dP}{dr} + \left(\frac{d\mu_i}{dC} \right)_{T,P} \frac{dC}{dr} \quad (\text{Gleichung 4.3}).$$

Setzt man als experimentelle Randbedingungen eine konstante Temperatur sowie die thermodynamische Idealtität der zu untersuchenden Lösung voraus, kann Gleichung 4.3 zu Gleichung 4.4 vereinfacht werden (van Holde *et al.*, 1998a).

$$\bar{V} \omega^2 \rho r + \frac{RT}{C} \frac{dC}{dr} - M_i \omega^2 r = 0 \quad (\text{Gleichung 4.4}),$$

\bar{V} : partielles molares Volumen; ρ : Dichte des Lösungsmittels.

Mit der Beziehung $\bar{V} = \bar{v} M_i$ ergibt sich aus Gleichung 4.4 nach Umformen und Integration die Konzentrationsverteilung einer monomeren, idealen Komponente im thermodynamischen Gleichgewicht (Gleichung 4.5):

$$C(r) = C(r_0) \exp \left[M_i (1 - \bar{v} \rho) \left(\frac{\omega^2}{2RT} \right) (r^2 - r_0^2) \right] + E \quad (\text{Gleichung 4.5})$$

$C(r)$: mittels Absorption oder Brechungsindex-Verschiebung bestimmte Konzentration an der radialen Position r ; $C(r_0)$: Konzentration an der Referenzposition r_0 (Meniskus);

ω : Winkelgeschwindigkeit des Rotors; R : Gaskonstante; T : Temperatur; M_r : Durchschnittsmolekulargewicht; \bar{v} : partielles spezifisches Volumen des untersuchten Moleküls; ρ : Dichte des Puffers; E : Basislinien-Offset.

Bei logarithmischer Auftragung von Gleichung 4.5 (d.h., $\ln C$ gegen r^2) erhält man aus der Steigung der resultierenden Geraden das Molekulargewicht des untersuchten Moleküls. Beim Vorliegen von mehr als einer Komponente in Lösung, wie es z.B. bei einem Monomer/Oligomer-Gemisch der Fall ist, ergibt die logarithmische Auftragung keine Gerade mehr. Durch Verwendung von Durchschnitts-Molekulargewichten M_r , für die gilt

$$M_r = \frac{\sum_2^n C_i M_i}{\sum_2^n C_i},$$

ist dennoch eine Bestimmung der Molekulargewichte aller Spezies möglich. Neuere Methoden verwenden numerische Lösungen zum direkten Anpassen der experimentellen Konzentrationsprofile an Gleichung 4.5 und somit zur Molekulargewichtsbestimmung der untersuchten Komponenten im Gleichgewicht (Kapitel 4.17.2).

Das Sedimentationsgeschwindigkeits-Experiment

Beim Sedimentationsgeschwindigkeits-Experiments wird ausgehend von einer homogenen Lösung die gelöste Komponente i durch eine im Vergleich mit dem Sedimentationsgleichgewichts-Experiment deutlich höhere Rotorgeschwindigkeit (bis 60000 rpm) zur Sedimentation in Richtung Boden der Zentrifugenzelle gezwungen. Im Verlauf der Zentrifugation (Abb. 4.3; durch unterschiedliche Zeitpunkte t_1 und t_4 gekennzeichnet) kommt es dadurch zu einer Verringerung der Konzentration von i in der Nähe des Meniskus und zur Ausbildung einer scharfen Grenzlinie (Abb. 4.3) zwischen dem genannten Bereich und einem Bereich mit gleichmäßiger Konzentrationsverteilung der sedimentierenden Komponente i (Abb. 4.3, Plateau). Aus der Wanderung der Grenzlinie kann der Sedimentationskoeffizient s bestimmt werden, welcher direkt proportional zum Molekulargewicht und indirekt proportional zum Reibungskoeffizienten der sedimentierenden Moleküle ist (Gleichung 4.6).

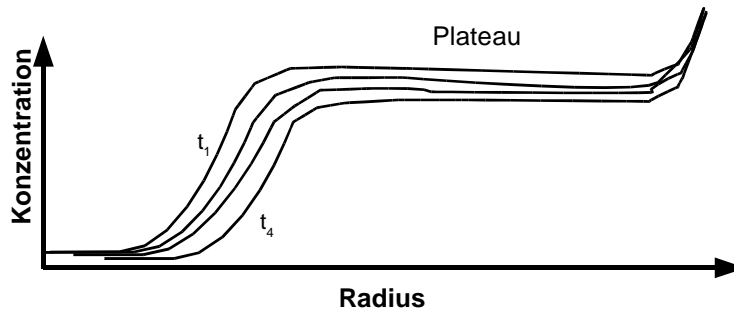


Abbildung 4.3: Bewegung einer Grenzlinie bei einem Sedimentationsgeschwindigkeits-Experiment. Mit zunehmender Sedimentation zum Boden der Zelle (durch die Zeitpunkte t_1 und t_4 gekennzeichnet) nimmt die Konzentration in der Plateau-Region durch radiale Verdünnung ab.

Die Definition von s folgt aus dem vorherrschenden Kräftegleichgewicht nach beendeter Beschleunigung des Rotors, für das gilt:

$$\omega^2 r m - \omega^2 r m_0 - f v = 0 \quad ,$$

wobei $\omega^2 r m$ die Zentrifugalkraft, $\omega^2 r m_0$ und $f v$ die entgegengesetzt gerichtete Auftriebs- bzw. Reibungskraft der Moleküle in Lösung ist.

Der Sedimentationskoeffizient s wird in der Einheit Svedberg (S) beschrieben, wobei 1 S 10^{-13} s entspricht. s ist als geräteunabhängige Größe definiert und kann durch Umformung obiger Gleichung abgeleitet werden (Ralston, 1993):

$$\frac{v}{\omega^2 r} = s = \frac{M(1 - \bar{v} \rho)}{N_A f} \quad \text{oder} \quad s = \frac{M(1 - \bar{v} \rho) D}{RT} \quad (\text{Gleichung 4.6}),$$

m_0 : Masse des verdrängten Lösungsmittels; m : Molekülmasse; v : Geschwindigkeit der Moleküle; f : Reibungskoeffizient der Moleküle; N_A : Avogadrozahl; D : Diffusionskoeffizient.

Im Verlauf des Experiments kommt es zur Diffusionsverbreiterung der wandernden Grenzlinie, die durch eine thermodynamische Betrachtungsweise beschrieben werden kann. Dabei ist zu beachten, daß beim Sedimentationsgeschwindigkeits-Experiment keine Gleichgewichtssituation vorliegt. Die Änderung $d\bar{\mu}_i/dr$ des gesamten chemischen Potentials $\bar{\mu}_i$ (Gleichung 4.1) ist demnach von null verschieden und es resultiert ein Fluß der Moleküle in Richtung Boden der Zentrifugenzelle. Dabei leisten Sedimentation und Diffusion einen Beitrag zum Nettofluß, wobei die Diffusionsrichtung der der Sedimentation entgegengerichtet sein kann (Abb. 4.4).

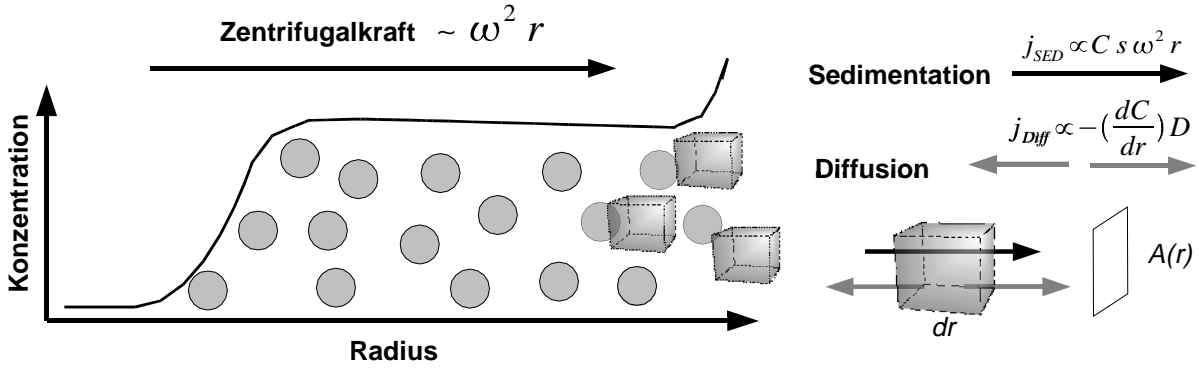


Abbildung 4.4: Schematische Darstellung der Sedimentation. Der Fluß sedimentierender Moleküle (graue Kreise) durch beliebige kubische Volumenelemente mit Querschnittsfläche $A(r)$ und Kantenlänge dr ist angedeutet. Die Richtung der Sedimentation, bzw. Diffusion ist durch schwarze, bzw. graue Pfeile gekennzeichnet. j_{SED} : Fluß durch Sedimentation; j_{Diff} : Fluß durch Diffusion.

Allgemein wird der Teilchenfluß durch das erste Fick'sche Diffusionsgesetz beschrieben, welches durch Anwendung eines um das Zentrifugalfeld erweiterten chemischen Potentials (Gleichung 4.1) für die Ultrazentrifugation erweitert werden kann (van Holde *et al.*, 1998b). Damit folgt für den Nettofluß $j(r)$ durch ein beliebiges kubisches Volumenelement mit Querschnitt $A(r)$ und Kantenlänge dr (Gleichung 4.7 und Abb. 4.4):

$$j(r) = C s \omega^2 r - D \left(\frac{dC}{dr} \right) \quad (\text{Gleichung 4.7}),$$

wobei D der Diffusionskoeffizient bei konstantem Druck und Temperatur ist.

Dieser Teilchenfluß verursacht für die Dauer eines beliebigen Zeitintervalls Δt eine Massendifferenz im betrachteten Volumenelement, welche als eine zeitliche Konzentrationsänderung betrachtet werden und entsprechend dem zweiten Fick'schen Diffusionsgesetz folgenderweise formuliert werden kann (van Holde *et al.*, 1998b):

$$\frac{dC}{dt} = - \frac{dj}{dr} \quad (\text{Gleichung 4.8}).$$

Ist das betrachtete Volumenelement nicht kubisch, sondern sektorförmig, wie es bei realen Zentrifugenzellen der Fall ist, kommt es zu einer Änderung der Querschnittsfläche mit zunehmendem Radius r . Die Berücksichtigung dieses Beitrags führt zur Formulierung der Lamm-Gleichung (Lamm, 1929; Gleichung 4.9), die als allgemeine Differentialgleichung der Ultrazentrifugation bezeichnet wird und eine Modifikation von Gleichung 4.8 darstellt.

$$\frac{dC}{dt} = - \frac{1}{r} \frac{d}{dr} \left[r \left(C s \omega^2 r - D \frac{dC}{dr} \right) \right] \quad (\text{Gleichung 4.9}).$$

Die Lamm-Gleichung ermöglicht die Beschreibung aller Sedimentationsvorgänge, einschließlich der Gleichgewichtssituation, unabhängig von Molekulargewicht und Diffusionskoeffizient der sedimentierenden Spezies. Aufgrund der großen praktischen Bedeutung dieser Differentialgleichung wurden unterschiedliche näherungsweise analytische Lösungen für bestimmte Idealfälle abgeleitet (für Beispiele siehe u.a. <http://www.analytical-ultracentrifugation.com>). Neuere Strategien zur Lösung der Lamm-Gleichung sind numerische Simulationen, von denen eine der neuesten und erfolgreichsten Strategien im nachfolgenden Abschnitt kurz erläutert werden soll, da diese Methode für die Auswertung der in dieser Arbeit durchgeführten Sedimentationsgeschwindigkeits-Experimente angewandt wurde (Schuck, 1998).

Für eine numerische Simulation der experimentellen Konzentrationsprofile eines Sedimentationsgeschwindigkeits-Experiments ist eine Diskretisierung der gemessenen Daten notwendig. Beim *finite-element*-Ansatz mit beweglichem Referenzrahmen (Schuck, 1998) werden die Konzentrationsprofile $C(r, t)$ als Summe von zeitabhängigen Dachfunktionen $P_k(r, t)$ unterschiedlicher Amplitude dargestellt (Abb. 4.5; Gleichung 4.10).

$$C(r, t) \approx \sum_{k=1}^N C_k(t) P_k(r, t) \quad (\text{Gleichung 4.10}).$$

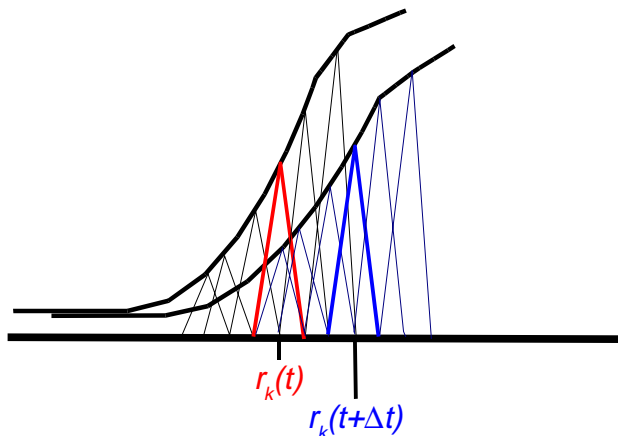


Abbildung 4.5: Schematische Darstellung von Konzentrationsprofilen eines Sedimentationsgeschwindigkeits-Experiments als Summe von Dachfunktionen $P_k(r, t)$ (nach: Sedfit-Tutorials, <http://www.analyticalultracentrifugation.com/LammEqSolutions.htm>). Die Beschreibung eines Konzentrationsprofils zu einem beliebigen späteren Zeitpunkt $t+\Delta t$ entspricht einer Verschiebung des radialen Gitters von $r_k(t)$ um Δt . Dadurch ist nur eine minimale Änderung der Amplitude von $P_k(r, t)$ erforderlich (vgl. rote und hellblaue Funktion).

Legt man ein diskretes radiales Gitters r_k zugrunde, das sich wie ein ideales, sedimentierendes und diffusionsfreies Molekül verhält, ist bei der Beschreibung des Konzentrationsprofils zu einem späteren Zeitpunkt (Abb. 4.5; Position $r_k(t+\Delta t)$, blaue Funktionen) nur eine minimale Anpassung der Amplitude $C_k(t)$ der Funktion $P_k(r, t)$ notwendig (Abb. 4.5; vgl. rote und

hellblaue Funktion). Dadurch wird aus der Sicht des beweglichen Referenzrahmens keine Sedimentation, sondern lediglich Diffusion beobachtbar sein. Die entsprechenden Werte für $C_k(t)$ können dann analytisch durch Multiplikation jeweils eines Elements $P_k(r, t)$ mit der Lamm-Gleichung und anschließender Integration vom Meniskus bis zum Boden der Zentrifugenzelle berechnet werden.

Bei der Lösung der Lamm-Gleichung ist weiterhin die Abhängigkeit des Sedimentationskoeffizienten s vom Molekulargewicht M und Diffusionskoeffizienten D zu berücksichtigen (Gleichung 4.6), welcher wiederum vom Reibungskoeffizienten f und somit von Form und Hydratationsgrad der Moleküle abhängt. Eine Vereinfachung dieser Beziehung kann durch den Vergleich mit einem idealen sphärischen, nicht-hydratisierten Molekül gleichen Molekulargewichts und partiellen spezifischen Volumens erreicht werden. Die tatsächliche Molekülform wird dann durch das Verhältnis (f/f_0) des tatsächlichen Reibungskoeffizienten f zu dem einer hydrاتفreien Kugel f_0 beschrieben. Bei globulären Proteinen ist dieses Verhältnis f/f_0 etwa 1,2 und nimmt mit zunehmender Asymmetrie der Moleküle zu. Mit dieser aus der Stoke'schen Gleichung abgeleiteten Beziehung ist dann eine Beschreibung des Molekulargewichts (Gleichung 4.11) bzw. des Diffusionskoeffizienten (Gleichung 4.12) als Funktion von s möglich (η = Viskosität des Lösungsmittels).

$$\frac{M}{N_a} = \frac{s}{1 - \bar{v} \rho} \left(\frac{f}{f_0} \right) 6 \pi \eta \left(\frac{3}{4 \pi} \frac{M}{N_a} \bar{v} \right)^{1/3} \quad (\text{Gleichung 4.11}),$$

$$D(s) = \frac{sRT}{M(s)(1 - \bar{v} \rho)} \quad (\text{Gleichung 4.12}).$$

Die bislang beschriebenen Annahmen und Vereinfachungen ermöglichen eine numerische Simulation aller experimentellen Sedimentationsdaten. Für die Bestimmung der molekularen Größenverteilung von Proteinen in einer Probe, sowie für die Bestimmung von s , D und f/f_0 aus diesen simulierten Daten besitzen die differentiellen Verteilungsfunktionen von Lösungen der Lamm-Gleichung ($c(s)$) (Schuck, 2000; Schuck *et al.*, 2002) die zur Zeit höchste Empfindlichkeit und Auflösung (Gl. 4.13, 4.14). Enthält eine Probe mehr als eine sedimentierende molekulare Spezies, wie es z.B. bei einem Monomer/Oligomer-Gemisch der Fall ist, wird das Sedimentationsverhalten aller Komponenten durch eine Überlagerung von Lösungen der Lamm-Gleichung für jede diskrete molekulare Spezies beschrieben. Umgekehrt kann eine Verteilungsfunktion von Sedimentationskoeffizienten $c(s)$ oder Molekular-

gewichteten $c(M)$ alle durch die experimentellen Daten beschriebenen Spezies beschreiben (Gleichungen 4.13 und 4.14).

$$a(r, t) \equiv \int c(s) L(s, D(s), r, t) ds + \epsilon \quad (\text{Gleichung 4.13}),$$

$$a(r, t) \equiv \int c(M) L(M, D, r, t) dM + \epsilon \quad (\text{Gleichung 4.14}),$$

mit $a(r, t)$: gemessene Absorptions- oder Interferenzprofile; $L(s, D(s), r, t)$ und $L(M, D, r, t)$: Lösungen der Lamm-Gleichung für diskrete Werte von s bzw. M und $D(s)$; ϵ : Rauschen.

Ausgehend von einer anfänglichen Abschätzung für f/f_0 erfolgt die Lösung der Lamm-Gleichung dabei mit den oben beschriebenen Vereinfachungen (Gleichungen 4.10-4.12) für diskrete Werte von s oder M . Die Simulationen ermöglichen außerdem eine gleichzeitige Optimierung von f/f_0 (Schuck *et al.*, 2002).

4.17.2 Experimentelle Durchführung

Alle Sedimentationsexperimente wurden am *Institute for Molecular Bioscience* (IMB) und *Australian Research Council Special Research Centre for Functional and Applied Genomics* der Universität von Queensland (Brisbane, Australien) in Zusammenarbeit mit und unter Anleitung von Dr. Amanda Nourse (Arbeitsgruppe: Prof. David Craik) durchgeführt.

Für die Durchführung stand eine analytische Ultrazentrifuge vom Typ Optima XL-I (Beckman Coulter, Fullerton, USA) zur Verfügung, welche Detektionssysteme zur lokalen Messung der Absorption oder des Brechungsindex in einer Probe besitzt. Es wurden Doppelsektorzellen mit Saphir-Fenstern und Aluminium-gefülltem Kunststoffkern oder mit Titankern (Schichtdicke: 1,2 cm; Nanolytics GmbH, Dallgow) in einem An-60 Ti Rotor (Beckman) verwendet.

Probenvorbereitung und Allgemeines

Natürliches (Dr. Axel Schulz, IPF PharmaCeuticals, Hannover) und rekombinantes Proguanylin sowie rekombinantes Proguanylin- $\Delta(28-37)$ (Kapitel 4.13.3) wurden in Konzentrationen zwischen 0,9 mM und 1 mM in 50 mM Natrium-Phosphat, 50 mM NaCl, pH 7,4 gelöst und für mindestens 20 h gegen diesen Puffer dialysiert. Anschließend wurden Verdünnungen mit Endkonzentrationen zwischen 0,3 und 1 mM hergestellt. Bei der Durchführung der Sedimentationsexperimente diente der verwendete Dialysepuffer als Referenzlösung.

Basierend auf der Aminosäurezusammensetzung wurden der molare Extinktionskoeffizient bei 280 nm ($\epsilon_{280} = 1865 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), das partielle spezifische Volumen (Proguanylin: $\bar{v} = 0,737 \text{ l/g}$; Proguanylin- $\Delta(28-37)$: $\bar{v} = 0,7348 \text{ l/g}$) und das Molekulargewicht (natürliches Proguanylin: $M = 10337 \text{ Da}$; rekombinantes Proguanylin: $M = 10491 \text{ Da}$; Proguanylin- $\Delta(28-37)$: $M = 9351 \text{ Da}$) der untersuchten Proteine berechnet (Programm : Sednterp; Laue *et al.*, 1992).

Sedimentationsgleichgewichts-Experimente

Für die Durchführung der Sedimentationsgleichgewichts-Experimente wurden die Doppelsektorzellen jeweils mit 120-130 μl der entsprechenden Proteinlösung und 140-150 μl Referenzlösung befüllt.

Das Sedimentationsgleichgewicht wurde nach Zentrifugation für etwa 20 h bei 20 °C und Rotorgeschwindigkeiten von 20000 bzw. 25000 rpm erreicht. Die Detektion erfolgte dabei durch Messung der Verschiebung des Brechungsindex oder durch Messung der Absorption bei 280 nm. Die Absorptionsdaten wurden in radialen Inkrementen von 0,003 cm bei gleichzeitiger Mittelung der Daten über jeweils drei Meßwerte aufgenommen.

Die detektierten Absorptions- und Brechungsindex-Werte wurden durch numerische Analyse mit dem Programm MSEDEQI (Dr. Allen Minton, National Institute of Health, Bethesda) in MATLAB bzw. mit Sedfit (<http://www.analyticalultracentrifugation.com>) an das Durchschnittsmolekulargewicht (M_r) der untersuchten Moleküle angepaßt. Dabei wurde die Konzentrationsverteilung einer einzelnen, idealen molekularen Spezies im thermodynamischen Gleichgewicht zugrundegelegt (Kapitel 4.17.1; Gleichung 4.5).

Sedimentationsgeschwindigkeits-Experimente

Für die Durchführung der Sedimentationsgeschwindigkeits-Experimente wurden die Doppelsektorzellen jeweils mit 240-290 μl der entsprechenden Proteinlösung und 250-300 μl Referenzlösung befüllt.

Vor dem Beginn der Experimente wurde der Rotor in der Vakuumkammer der Zentrifuge für etwa 2 h bei 20 °C äquilibriert, um während der gesamten Dauer der Experimente eine konstante Proben temperatur zu gewährleisten. Die Rotorgeschwindigkeit ist bei diesen Experimenten von den jeweils verwendeten Doppelsektorzellen abhängig: Bei Verwendung der Aluminium-gefüllten Kunststoffkerne ist die Rotorgeschwindigkeit auf 40000 rpm limitiert,

während mit den Titankernen die Maximalgeschwindigkeit der Zentrifuge von 60000 rpm möglich ist. Die Durchführung aller Sedimentationsgeschwindigkeits-Experimente erfolgte bei 20 °C und die Detektion wurde ebenfalls durch Messung der Verschiebung des Brechungsindex, bzw. durch Messung der Absorption bei 280 nm in radialen Inkrementen von 0,003 cm realisiert. Die Detektion der Brechungsindex- und Absorptionsdaten erfolgte in Zeitintervallen zwischen 30 und 300 s ohne Mittelung der einzelnen Meßwerte und über einen Zeitraum von etwa 4 h.

Die gemessenen Absorptionsdaten oder Brechungsindex-Verschiebungen wurden durch numerische Lösungen der Lamm-Gleichung (Gleichung 4.9) mit dem Programm Sedfit (<http://www.analyticalultracentrifugation.com>) theoretisch beschrieben (Kapitel 4.17.1) und als integrale Verteilung von Sedimentationskoeffizienten oder Molekulargewichten dargestellt (Kapitel 4.17.1; Gleichung 4.13 und 4.14). Dabei wurde die Lamm-Gleichung mit Hilfe der *finite element*-Methode mit statischem oder beweglichen Referenzrahmen gelöst (Claverie, 1976; Schuck, 1998). Dazu wurde bei der Berechnung aller Größenverteilungen ein radiales Gitter von 1000 Radiuswerten zwischen Meniskus und Boden, ein Konfidenzniveau der Regularisierung nach der Maximum-Entropie-Methode von $p = 0,95$ und eine einem Molekulargewichts-Bereich von 0,5 bis 100 kDa entsprechende Auflösung der Verteilungsfunktion von 100 Sedimentationskoeffizienten zwischen 0,2 und 10 S zugrunde gelegt. Das Verhältnis der Reibungskoeffizienten zu denen einer hydrاتفreien Kugel f/f_0 (Kapitel 4.17.1) wurde beim Anpassen der experimentellen Daten automatisch optimiert (Schuck *et al.*, 2002) und zusammen mit den berechneten partiellen spezifischen Volumina der untersuchten Proteine zur Berechnung der Diffusionskoeffizienten verwendet.

4.18 CD-Spektroskopie

4.18.1 Probenvorbereitung

Lyophilisiertes Protein (Kapitel 4.13.3) wurde in Konzentrationen zwischen 30 und 150 μM in den unten aufgeführten Puffern gelöst. Die erhaltenen Protein-Stammlösungen wurden nach Konzentrationsbestimmung (Kapitel 4.2) mit dem entsprechenden Puffer jeweils auf eine Endkonzentration zwischen 3 und 10 μM verdünnt.

Um eine mögliche pH-Abhängigkeit der CD-Spektren von natürlichem und rekombinantem Proguanylin zu untersuchen, wurden folgende Probenpuffer verwendet: 10 mM Kalium-Phosphat, pH 5,0 bzw. pH 6,0, 10 mM Natrium-Phosphat, pH 7,4 und H_2O (bidest). Nach

dem Lösen der Proteine in Wasser lag der pH-Wert bei etwa 4,0.

Für alle weiteren CD-Spektren wurde 10 mM Kalium-Phosphat, pH 6,0 als Puffer verwendet.

4.18.2 Gerät und Meßbedingungen

Fern-UV-CD-Spektren von natürlichem und rekombinantem Proguanylin sowie von verschiedenen Proguanylin-Mutanten wurden an einem Jasco J-810 Spektropolarimeter (Jasco, Gross-Umstadt) bei 20 °C in Rechteckküvetten einer Schichtdicke von 1 mm aufgenommen. Die Spektren wurden für einen Wellenlängenbereich von 260-185 nm mit einer Bandbreite von 1 nm, einer Auflösung von 0,2 nm, einer Empfindlichkeit von 100 mdeg und einer Meßgeschwindigkeit von 20 nm/min gemessen. Es wurden jeweils 6 Spektren akkumuliert und das jeweilige Pufferspektrum als Referenz subtrahiert.

Die aus dem Differenzspektrum erhaltene Elliptizität Θ wurde mit Hilfe von Gleichung 4.15 (Schmid, 1989) in die mittlere molare Elliptizität pro Aminosäurerest $[\Theta]_{MRW}$ umgerechnet und gegen die Wellenlänge aufgetragen.

$$[\Theta]_{MRW} = \frac{100 \Theta}{c l N_A} \quad (\text{Gleichung 4.15}),$$

c : Proteinkonzentration in mol/l; l : Schichtdicke der Küvette in cm; N_A : Anzahl der Aminosäuren; Θ : gemessene Elliptizität in deg; $[\Theta]_{MRW}$: mittlere molare Elliptizität pro Aminosäurerest (deg cm² dmol⁻¹).

Der Einfluß der Temperatur auf die Sekundärstruktur von natürlichem und rekombinantem Proguanylin wurde durch Messung der Elliptizität bei 208 nm untersucht. Dazu wurde die Temperatur mit Hilfe eines Peltier Kontrollelements und einer CDF-426S Temperatureinheit (Jasco, Gross-Umstadt) mit einer konstanten Heizrate von 1 °C/min von 20 °C auf 100 °C erhöht und mit der gleichen Rate wieder auf 20 °C gesenkt. Eine gleichmäßige Temperaturverteilung in der Küvette wurde durch Verwendung einer 1 cm Küvette mit Magnetrührkern erreicht.

Zusätzlich zur Messung der Elliptizität bei 208 nm wurden vor dem Aufheizen und nach dem Abkühlen (jeweils bei 20 °C) sowie bei 90 °C CD-Spektren von 260-185 nm mit den oben aufgeführten Meßparametern aufgenommen.

4.19 NMR Spektroskopie

4.19.1 Probenvorbereitung

Für die Durchführung von dreidimensionalen NMR-Experimenten wurde ^{15}N oder $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ markiertes, lyophilisiertes Proguanylin (Kapitel 4.13.3) in 250 μl 50 mM Kalium-Phosphat (10 % D_2O , v/v), pH 6,0 gelöst. Die Konzentration des gelösten Proteins betrug 1,1 mM für ^{15}N markiertes und 0,9 mM für $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ markiertes Proguanylin. Für die Aufnahme von homonuklearen ^1H -2D-NMR Spektren wurde eine Probe mit natürlichem Proguanylin (ca. 2 mM Protein in 0,5 ml D_2O (99,994 %), pH 4,0; Schulz *et al.*, 1999) lyophilisiert und in 500 μl 50 mM Kalium-Phosphat/10 % D_2O (v/v), pH 6,0 gelöst, um mit den isotopenmarkierten Proben übereinstimmende Bedingungen zu erhalten.

4.19.2 Allgemeines

Alle NMR-Experimente wurden an Spektrometern der Firma Bruker (Karlsruhe) vom Typ Avance400 oder DRX600 mit einem inversen $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}/(^{31}\text{P})$ Tripel- oder Quadrupelresonanz-Probenkopf mit aktiv abgeschirmten Gradientenspulen durchgeführt. Als Ausnahme wurde das ^{13}C -NOESY-HSQC an einem Avance800 NMR Spektrometer (Bruker, Zürich) mit inversem $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ Tripelresonanz-Kryoprobenkopf mit Dreiaachsen-Gradienten aufgenommen. Die Aufnahme aller Spektren geschah im phasensensitiven Modus mit Quadraturdetektion in beiden Zeitdimensionen unter Verwendung der *States*-TPPI-Technik (*time proportional phase incrementation*; Marion *et al.*, 1989). Nur bei Experimenten mit abschließendem Gradientenecho zur Kohärenz-Selektion (Sattler *et al.*, 1995; Schleucher *et al.*, 1994) wurde die Echo/Antiecho Methode verwendet (Kay *et al.*, 1992).

Die Unterdrückung der Wasserresonanz wurde bei Experimenten mit Detektion der Amidprotonen durch Verwendung einer 3-9-19 *Watergate* Binominalsequenz (Sklenar *et al.*, 1993) mit *Waterflipback* (Grzesiek & Bax, 1993b) realisiert. In den übrigen 3D-Experimenten wurden gepulste Feldgradienten zur Kohärenz-Selektion verwendet (Schleucher *et al.*, 1994), um die Wasserresonanz zu unterdrücken. Kohlenstoffpulse wurden als bandselektive Pulse (BURP; G3-, G4-Gauß-Kaskaden; Emsley & Bodenhausen, 1990; Geen & Freeman, 1991) ausgeführt, um eine Unterscheidung von aliphatischen und Carbonyl-Resonanzen zu ermöglichen (Sattler *et al.*, 1999).

Die Entkopplung der Heterokerne während der Aufnahme des FID (*free induction decay*) erfolgte durch die GARP-Sequenz (Shaka *et al.*, 1985). Zur Breitbandentkopplung von

Protonen wurde die WALTZ-16-Sequenz (Shaka *et al.*, 1983) und für die bandselektive ^{13}C -Entkopplung MLEV-4-erweiterte offresonante Gauß-Kaskaden verwendet (Eggenberger *et al.*, 1992).

Für den Feld-Frequenz-Lock wurde die Resonanzfrequenz des zugesetzten D_2O verwendet. Die Spektren wurden bei 293 K oder 298 K gemessen, wobei die Temperaturkontrolle mit Hilfe einer BVT3000 (*variable temperature*) Kontrolleinheit der Firma Bruker erfolgte. Die Referenzierung der ^1H chemischen Verschiebungen erfolgte relativ zu DSS (2,2-Dimethyl-2-silapentan-5-sulfonat) in D_2O als externen Standard. Die chemischen Verschiebungen von ^{15}N und ^{13}C wurden indirekt über das Frequenzverhältnis der Nullpunktsfrequenzen ($\omega_{\text{N}}/\omega_{\text{H}} = 0.101329118$; $\omega_{\text{C}}/\omega_{\text{H}} = 0.251449530$; Markley *et al.*, 1998) geeicht.

4.19.3 NMR-Experimente zur Strukturbestimmung von Proguanylin

Nachfolgend sind die für die sequenzspezifische Zuordnung und Strukturbestimmung von Proguanylin durchgeführten NMR-Experimente unter Angabe der Aufnahmeparameter aufgeführt. Soweit nicht anders vermerkt, wurden alle Experimente an einem DRX600 Spektrometer bei 293 K aufgenommen. Dabei bedeutet NS (*number of scans*) die Anzahl der akkumulierten FIDs je Inkrement, SW (*sweep width*) die Breite des spektralen Fensters in der jeweiligen Dimension in Hz, F(1,2,3) die jeweilige Dimension eines mehrdimensionalen Experiments und TD (*time domain*) die Anzahl der gemessenen komplexen Datenpunkte. Die verwendeten Pulsprogramme sind ebenfalls angegeben.

Experimente mit ^{15}N Proguanylin in 50 mM Kalium-Phosphat/ D_2O , pH 6,0

^{15}N -HSQC (Mori <i>et al.</i> , 1995)		Kern	SW (Hz)	TD
NS 16	F1	^{15}N	1824,5	384
Pulsprogramm: fhsqcN15.ks	F2	^1H	7184	2048
^{15}N -TOCSY-HSQC (Zhang <i>et al.</i> , 1990)		Kern	SW (Hz)	TD
NS 8	F1	^1H	7184	256
Pulsprogramm: tocsyhsqc02_ks	F2	^{15}N	1824,5	64
Mischzeit 80 ms	F3	^1H	7184	1024

¹⁵ N-NOESY-HSQC (Talluri & Wagner, 1996)		Kern	SW (Hz)	TD
NS 16	F1	¹ H	7184	256
Pulsprogramm: nsyhsqc_ks	F2	¹⁵ N	1824,5	64
Mischzeit 120 ms	F3	¹ H	7184	1024
¹⁵ N-HMQC-NOESY-HSQC (Frenkiel <i>et al.</i> , 1990; Ikura <i>et al.</i> , 1990a)		Kern	SW (Hz)	TD
NS 32	F1	¹⁵ N	1824,5	64
Pulsprogramm: nnhnoesy_ks	F2	¹ H	7184	1024
Mischzeit 150 ms	F3	¹⁵ N	1824,5	96
HNHA (Vuister & Bax, 1993; Zhang <i>et al.</i> , 1997)		Kern	SW (Hz)	TD
NS 8	F1	¹ H	5000	180
Pulsprogramm: hnha_ks	F2	¹⁵ N	1824,5	64
	F3	¹ H	7184	1024

Experimente mit ¹³C/¹⁵N Proguanylin in 50 mM Kalium-Phosphat/D₂O, pH 6,0

HNCO (400 MHz) (Grzesiek & Bax, 1992b; Ikura <i>et al.</i> , 1990b)		Kern	SW (Hz)	TD
NS 16	F1	¹³ C	1509	80
Pulsprogramm: hnco02_pn	F2	¹⁵ N	1176	64
	F3	¹ H	4789	1024
HNCA (Grzesiek & Bax, 1992b; Ikura <i>et al.</i> , 1990b)		Kern	SW (Hz)	TD
NS 32	F1	¹³ C	4225	80
Pulsprogramm: hnca02_ks	F2	¹⁵ N	1764	64
	F3	¹ H	7184	1024

CBCA(CO)NH (Grzesiek & Bax, 1992a)		Kern	SW (Hz)	TD
NS 32	F1	^{13}C	8753	112
Pulsprogramm: cbcaconh02_ks	F2	^{15}N	1481	64
	F3	^1H	7184	1024
HBHA(CO)NH (Grzesiek & Bax, 1993a)		Kern	SW (Hz)	TD
NS 32	F1	^1H	3000	112
Pulsprogramm: hbhaconh02_pn	F2	^{15}N	1764	64
	F3	^1H	7184	1024
C(CO)NH (Grzesiek <i>et al.</i> , 1993)		Kern	SW (Hz)	TD
NS 40	F1	^{13}C	10563	128
Pulsprogramm: cconh_ks	F2	^{15}N	1764	64
Mischzeit 16 ms	F3	^1H	7184	1024
H(CCO)NH (Grzesiek <i>et al.</i> , 1993)		Kern	SW (Hz)	TD
NS 40	F1	^1H	3600	128
Pulsprogramm: hcconh_pn	F2	^{15}N	1764	64
Mischzeit 16 ms	F3	^1H	7184	1024
^{13}C -NOESY-HSQC (Ikura <i>et al.</i> , 1990c) (800 MHz; 298 K)		Kern	SW (Hz)	TD
NS 8	F1	^1H	4800	128
Pulsprogramm: noesietgp3d.3	F2	^{13}C	7846	46
Mischzeit 150 ms	F3	^1H	11161	2048
$^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ F2-gefiltertes 2D NOESY (Zwahlen <i>et al.</i> , 1997)		Kern	SW (Hz)	TD
NS 46; Mischzeit 150 ms	F1	^1H	8389	320
Pulsprogramm: noesywurst	F2	^1H	8389	4096

NMR-Experimente zur Messung von skalarer und dipolarer Kopplung

Für die automatische Zuordnung der Multipllettkomponenten der skalaren und dipolaren Kopplung wurde das ^1H , ^{15}N -HSQC Spektrum von ^{15}N markiertem Proguanylin verwendet.

Zur Messung der skalaren und dipolaren ^1H - ^{15}N Kopplung wurde das nachfolgende Experiment zweimal in nicht orientierter Lösung und zweimal in einer durch Zugabe des filamentösen Bakteriophagen Pf1 (Endkonzentration von Pf1 in der NMR-Probe: 21 mg/ml; Asla Biotech, Litauen) generierten anisotropen Lösung durchgeführt (Hansen *et al.*, 1998).

^{15}N -IPAP-HSQC (Ottiger <i>et al.</i> , 1998)		Kern	SW (Hz)	TD
NS 16	F1	^{15}N	1824,5	1024
Pulsprogramm: ipapil.ks	F2	^1H	7184	384

Kopplungskonstanten wurden aus der Duplett-Aufspaltung in der indirekten ^{15}N Dimension erhalten. Dabei wurde der Beitrag der residualen dipolaren Kopplung (D_{NH}) durch Subtraktion des aus den Referenzspektren ermittelten Anteils der skalaren $^1J_{\text{NH}}$ Kopplung berechnet. Die bestimmten Kopplungskonstanten wurden jeweils über die beiden durchgeführten Experimente gemittelt.

Zusätzliche NMR-Experimente

Zu Beginn der Arbeit stand ein Satz homonuklearer 2D-Spektren von natürlichem, aus menschlichem Hämofiltrat isoliertem Proguanylin zu Verfügung (Schulz *et al.*, 1999), d.h. DQF-COSY, TOCSY und NOESY. Zusätzlich wurde ein weiteres 2D-NOESY Spektrum bei 293 K und einer Mischzeit von 150 ms aufgenommen, wobei die Pufferbedingungen in Übereinstimmung mit den markierten Proben gewählt wurden (Kapitel 4.19.1). Die Wasserunterdrückung für dieses Spektrum erfolgte durch Verwendung einer 3-9-19 *watergate* Binominalsequenz (Sklenar *et al.*, 1993).

Für die Identifizierung von langsam austauschenden Amidprotonen wurde die ^{15}N markierte Proguanylin-Probe lyophilisiert, in 500 μl D_2O (99,9 %) gelöst und eine Serie von ^1H , ^{15}N -HSQC Spektren aufgenommen. Die Spektren (Dauer: 27 min, 32 x 1024 komplexe Datenpunkte, 32 Akkumulationen) wurden zu folgenden Zeitpunkten nach Lösen des Proteins in D_2O gemessen: 8, 35, 62, 89 min. Abschließend wurde noch ein Spektrum mit 128 x 1024 komplexen Datenpunkten (32 Akkumulationen, Dauer 108 min) aufgenommen.

Für die Messung des heteronuklearen $\{^1\text{H}\}^{15}\text{N}$ NOE wurde die Pulssequenz von Dayie und Wagner (1994; Pulsprogramm: n15noe.ks, 600 MHz) verwendet. Das Referenzspektrum ohne Protonensättigung und das Spektrum mit Sättigung wurde mit 256 (^{15}N) x 1024 (^1H) komplexen Datenpunkten und 32 Akkumulationen aufgenommen. Das Relaxationsintervall zwischen den einzelnen Akkumulationen betrug bei beiden Experimenten 6 s. Die Protonensättigung wurde durch eine Abfolge von 120° -Pulsen bei voller Leistung während der letzten 3 s des Experiments erreicht. Die einzelnen Inkremente der Evolutionszeit in den indirekten Dimensionen der Spektren mit und ohne Sättigung der Protonen wurden abwechselnd in einem einzigen, kombinierten Experiment detektiert. Die erhaltenen Werte für den $\{^1\text{H}\}^{15}\text{N}$ NOE wurden über zwei unabhängige Datensätze gemittelt.

4.19.4 Experimente zur sequentiellen Zuordnung von Proguanylin-C86S/C94S

Nachfolgend sind die für die sequenzspezifische Zuordnung von ^{15}N Proguanylin-C86S/C94S durchgeführten NMR-Experimente unter Angabe der Aufnahmeparameter (Abkürzungen vgl. Kapitel 4.19.3) aufgeführt. Alle Experimente wurden an einem Bruker Avance400 Spektrometer bei 293 K aufgenommen.

^{15}N -HSQC (Mori <i>et al.</i> , 1995)		Kern	SW (Hz)	TD
NS 16	F1	^{15}N	912,4	128
Pulsprogramm: fhsqcN15.ks	F2	^1H	4789,3	1024
^{15}N -TOCSY-HSQC (Zhang <i>et al.</i> , 1990)		Kern	SW (Hz)	TD
NS 8	F1	^1H	4401,4	256
Pulsprogramm: n15tocsy.ks	F2	^{15}N	912,4	64
Mischzeit 80 ms	F3	^1H	4789,3	1024
^{15}N -NOESY-HSQC (Talluri & Wagner, 1996)		Kern	SW (Hz)	TD
NS 16	F1	^1H	4401,4	242
Pulsprogramm: n15noesy.ks	F2	^{15}N	912,4	64
Mischzeit 120 ms	F3	^1H	4789,3	1024

HNHA		Kern	SW (Hz)	TD
(Vuister & Bax, 1993; Zhang <i>et al.</i> , 1997)				
NS 8	F1	^1H	3000,9	160
Pulsprogramm: hnha2.ks	F2	^{15}N	912,4	56
	F3	^1H	4789,3	1024

4.19.5 Experimente mit ^{15}N Proguanylin- $\Delta(28-37)$ und ^{15}N Proguanylin-C48S/C61S

Nachfolgend ist das mit ^{15}N Proguanylin- $\Delta(28-37)$ und ^{15}N Proguanylin-C48S/C61S durchgeführte NMR-Experiment unter Angabe der Aufnahmeparameter (Abkürzungen vgl. Kapitel 4.19.3) aufgeführt. Die Experimente wurden an einem Bruker Avance400 Spektrometer bei 293 K aufgenommen.

^{15}N -HSQC (Mori <i>et al.</i> , 1995)		Kern	SW (Hz)	TD
NS 16	F1	^{15}N	912,4	128
Pulsprogramm: fhsqcN15.ks	F2	^1H	4789,3	1024

4.19.6 Prozessierung der NMR Spektren

Die Auswertung der erhaltenen Daten erfolgte an einem Sun Ultra Enterprise 450 Server (Sun Microsystems Inc., Palo Alto, USA) mit Hilfe der Programmpakete NDee (Spinup Inc., Dortmund) und NMRView5.0.4 (Johnson & Blevins, 1994) und am Lehrstuhl entwickelter Software (Schweimer, 2000).

Vor der Fouriertransformation wurden die FIDs aller homonuklearen 2D-Spektren mit einer um $\pi/4$ phasenverschobenen Sinusquadratfunktion multipliziert und die Anzahl der Datenpunkte in der t_1 -Dimension durch *zerofilling* auf 1K erhöht. Bei den 3D-Spektren wurde der FID vor der Fouriertransformation in jeweils einer der indirekten ^{15}N - oder ^{13}C - Dimension mittels *linear prediction* (Barkhuijsen *et al.*, 1985; Zhu & Bax, 1990) auf die doppelte Länge extrapoliert. Durch *zerofilling* wurde die Anzahl der Datenpunkte in allen Dimensionen auf mindestens die doppelte Länge gebracht und anschließend mit einer um $\pi/2$ oder $\pi/3$ phasenverschobenen Sinusquadratfunktion multipliziert.

Nach einer Phasenkorrektur für nullte und erste Ordnung erfolgte bei den 2D-Spektren eine Korrektur der Basislinie in allen Dimensionen und bei den 3D-Spektren eine Korrektur in der

direkten Dimension. Für die Basislinienkorrektur aller Spektren wurde ein *Model-free*-Algorithmus (Programm: base_fast; Friedrich, 1995; Schweimer, 2000) verwendet.

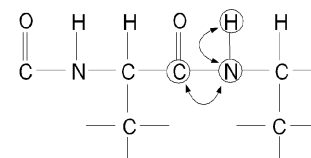
4.19.7 Sequentielle Zuordnung

Die sequenzspezifische Zuordnung der Spinsysteme erfolgte für Proguanylin und für Proguanylin-C86S/C94S nach unterschiedlichen Strategien.

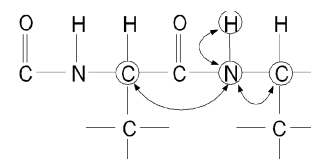
Für die sequentielle Zuordnung des Proteinrückgrats von Proguanylin wurde im Wesentlichen eine homogen $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ markierte Proguanylin-Probe verwendet (Kapitel 4.19.3). Die Identifizierung eines Aminosäure-Typs erfolgte dabei anhand der für den jeweiligen Typ charakteristischen chemischen Verschiebungen der $^{13}\text{C}\alpha$ und $^{13}\text{C}\beta$ Spins. Resonanzen sequentiell benachbarter Aminosäuren wurden mittels skalarer Kopplung gefunden (Abb. 4.6) und die Art der gefundenen Aminosäure wiederum anhand der chemischen Verschiebung bestimmt. Mehrdeutigkeiten bei der Zuordnung konnten durch das Auffinden sequentieller NOEs des Proteinrückgrats, dem sogenannten *chaintracing* (Wüthrich, 1986), aufgelöst werden (vgl. Kap. 5.1.5.1, Abb. 5.19).

Aufgrund der einfachen Markierung mit ^{15}N , erfolgte die Zuordnung von Proguanylin-C86S/C94S ausschließlich durch das *chaintracing*.

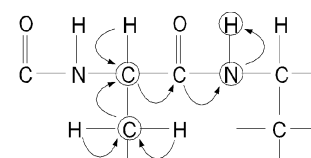
HNCO $^1\text{HN}(i) - ^{15}\text{N}(i) - ^{13}\text{CO}(i-1)$



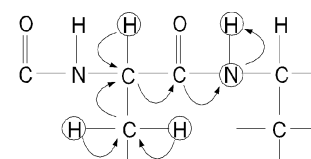
HNCA $^1\text{HN}(i) - ^{15}\text{N}(i) - ^{13}\text{C}\alpha(i)$
 $^1\text{HN}(i) - ^{15}\text{N}(i) - ^{13}\text{C}\alpha(i-1)$



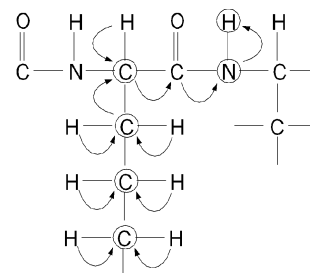
CBCA(CO)NH $^1\text{HN}(i) - ^{15}\text{N}(i) - ^{13}\text{C}\alpha(i-1)$
 $^1\text{HN}(i) - ^{15}\text{N}(i) - ^{13}\text{C}\beta(i-1)$



HBHA(CO)NH $^1\text{HN}(i) - ^{15}\text{N}(i) - ^1\text{H}\alpha(i-1)$
 $^1\text{HN}(i) - ^{15}\text{N}(i) - ^1\text{H}\beta(i-1)$



C(CO)NH

 $^1\text{HN}(i) - ^{15}\text{N}(i) - ^{13}\text{C}_{\text{aliphatisch}}(i-1)$ 

H(CCO)NH

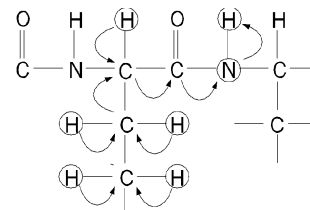
 $^1\text{HN}(i) - ^{15}\text{N}(i) - ^1\text{H}_{\text{aliphatisch}}(i-1)$ 

Abbildung 4.6: Magnetisierungstransfers in den verwendeten Tripelresonanzexperimenten. Der Verlauf der Transfers ist jeweils durch Pfeile angedeutet, die beobachteten Korrelationen sind eingekreist und in der mittleren Spalte angegeben.

4.19.8 Sekundäre chemische Verschiebung

Die chemischen Verschiebungen der $^1\text{H}\alpha$, $^{13}\text{C}\alpha$ und ^{13}CO Spins der Aminosäuren in regulärer Sekundärstruktur weisen im Vergleich zu kurzen, unstrukturierten Peptiden charakteristische Abweichungen auf. Diese Beobachtung ermöglicht eine Korrelation von chemischer Verschiebung und dem Vorliegen von Elementen mit regulärer Sekundärstruktur in einem Protein (Wishart *et al.*, 1991; Wishart *et al.*, 1992; Wishart *et al.*, 1995). So kann in α -helicalen Bereichen für die $^1\text{H}\alpha$ Protonen eine Verschiebung zu höherem Feld beobachtet werden, während bei β -Faltblättern eine Tieffeldverschiebung die Regel ist. Für die Verschiebungen der $^{13}\text{C}\alpha$ und ^{13}CO Spins ist der Trend umgekehrt.

Um Aminosäuren einem bestimmten Sekundärstrukturelement zuzuordnen, wird zunächst für jede Aminosäure ein sogenannter Verschiebungsindex (CSI; *chemical shift index*) durch Differenzbildung der beobachteten chemischen Verschiebung (δ_{exp}) und der für die jeweilige Aminosäure typischen Verschiebung in unstrukturierten Peptiden (δ_{rc}) berechnet ($\Delta\delta = \delta_{\text{exp}} - \delta_{\text{rc}}$). Bei Überschreitung eines bestimmten Schwellenwertes für $\Delta\delta$ wird ein CSI von ± 1 , bei Differenzen innerhalb des Toleranzbereiches wird ein CSI von 0 zugeordnet. Die Schwellenwerte sind $\pm 0,1$ ppm für $^1\text{H}\alpha$, $+0,8/-0,5$ ppm für $^{13}\text{C}\alpha$ und $\pm 0,5$ ppm für ^{13}CO (Wishart *et al.*, 1995).

Treten bei den $^1\text{H}\alpha$ Spins mindestens vier -1-Indices in sequentieller Folge auf, kann auf α -helikale Bereiche geschlossen werden, kommen mindestens drei +1-Werte nacheinander vor,

kann ein Einbezug in eine β -Faltblattstruktur angenommen werden. Bei den ^{13}C Spins ist auf ein entgegengesetztes Vorzeichen der Verschiebungsindices zu achten. Das Ende eines Strukturelements ist durch einen abrupten Wechsel von -1 zu +1 oder umgekehrt bzw. durch das Aufeinanderfolgen von mindestens zwei Nullen gekennzeichnet. Eine zuverlässigere Aussage kann durch Einbeziehung mehrerer Spins bei der Analyse erreicht werden. Nach Summierung der einzelnen Indices unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Vorzeichen von ^1H und ^{13}C Spins ($\text{CSI}(\text{ges}) = \text{CSI}(\text{H}\alpha) - \text{CSI}(\text{C}\alpha) - \text{CSI}(\text{CO})$) wurde dazu ein Konsensus-Index ($\text{CSI}(\text{Cons})$) bestimmt und gegen die Sequenzposition aufgetragen. Für einen Wert von $\text{CSI}(\text{ges}) \geq 2$ wurde dem Konsensus-Index ein Wert von +1 zugewiesen, für $\text{CSI}(\text{ges}) \leq -2$ wurde ein Wert von -1 zugeordnet.

Basierend auf dem Typ der aufgenommenen Tripelresonanzexperimente (Kapitel 4.19.3; Abb. 4.6) konnten die ^{13}CO Resonanzen der den Prolinresten NH_2 -terminal benachbarten Aminosäuren nicht zugeordnet werden. In diesen Fällen, bzw. wenn die Zuordnung einer der $^1\text{H}\alpha$, $^{13}\text{C}\alpha$ oder ^{13}CO Resonanzen eines Spinsystems nicht möglich war, wurde ein Konsensus-Index von +1, bzw. -1 bei einem $\text{CSI}(\text{ges}) = 2$, bzw. $= -2$ zugeteilt. Die Information über die sekundäre chemische Verschiebung der Leucinreste war aufgrund der fehlenden ^{13}C -Markierung (Kapitel 5.1.5.1 und 5.1.3.5) unvollständig. Für diese Aminosäuren wurde daher der Verschiebungsindex der $^1\text{H}\alpha$ Resonanzen als Konsensus-Index verwendet. Hinweise auf Elemente mit regulärer Sekundärstruktur wurden anhand der bereits für die $^1\text{H}\alpha$ Spins genannten Kriterien erhalten.

4.19.9 Analyse sekundärstrukturbestimmender NOEs

Sekundärstruktur bestimmende interresiduale und mittelweitreichende NOE-Kreuzresonanzen (Wüthrich, 1986) wurden mit dem Programm Vince (La Rosa *et al.*, 1996) gegen die Sequenzposition aufgetragen und analysiert.

4.20 Berechnung der dreidimensionalen Struktur von Proguanylin

4.20.1 Computer Hard- und Software

Alle Moleküldynamikrechnungen wurden auf einem Sun Ultra Enterprise 450 Server (Sun Microsystems Inc., Palo Alto, USA) mit dem Programm XPLOR, Version 3.8.5.1 (Brünger, 1993) durchgeführt.

Die graphische Darstellung erfolgte mit den Programmen RasMol V2.6 (Sayle, 1995), MolMol (Koradi *et al.*, 1996), Molscript 1.4 (Kraulis, 1991) und Raster3D, Version 2.0 (Merritt & Murphy, 1994), die Analyse der Strukturen mit den Programmen MolMol (Koradi *et al.*, 1996) und PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993).

4.20.2 Experimentelle Daten

Abstandsbeschränkungen aus NOESY-Daten

Zur Bestimmung der Abstandsintervalle wurden die ^{15}N -NOESY-HSQC, 2D-NOESY und ^{13}C -NOESY-HSQC Spektren verwendet. Entsprechend den Intensitäten der NOE-Kreuzresonanzen wurden diese in drei Abstandsintervall-Klassen eingeteilt, wobei sich die maximalen Abstände jeweils aus den NOE-Intensitäten ergeben (stark: 2,7 Å; mittel 3,5 Å, schwach: 5,0 Å). Die in Proguanylin vorhandenen Disulfidbrücken (Cys 48 – Cys 61, Cys 83 – Cys 91, Cys 86 – Cys 94) wurden durch jeweils eine Distanzbeschränkung mit einem Abstand der Schwefelatome d_{SS} von $2,02 \pm 0,1$ Å berücksichtigt.

Für die ersten Strukturberechnungen wurden nur eindeutig bestimmte Distanzintervalle und die Kopplungskonstanten (s.u.) eingesetzt. Aus den erhaltenen Daten der zehn energieärmsten Strukturen wurden mit dem Programm "AssignNOE" (Schweimer, 2000) die Mittelwerte aller auftretenden Abstände bestimmt und mit den NOE-Listen verglichen. Konnten mehrere NOEs zwischen zwei Aminosäuren beobachtet werden und waren die entsprechenden Distanzen im Durchschnitt bereits erfüllt, wurden die zugehörigen Abstandsintervalle bei der folgenden Strukturberechnung mit herangezogen. Dieser iterative Prozeß wurde mehrmals wiederholt.

Beschränkung der Diederwinkel durch J-Kopplungskonstanten

Die Größe von Kopplungskonstanten $^3J(\text{HN}, \text{H}\alpha)$ ist abhängig vom Diederwinkel (Karplus, 1959) und kann für eine Einschränkung der ϕ -Winkel des Proteinrückgrats herangezogen werden (Wüthrich, 1986). Für Strukturberechnungen wurden nur Kopplungskonstanten kleiner 6 Hz, bzw. größer 8 Hz berücksichtigt, die für α -Helices ($\phi = -60 \pm 20^\circ$) bzw. β -Faltblattstränge ($\phi = -120 \pm 40^\circ$) typisch sind. Die Berechnung der Kopplungskonstanten erfolgte nach Gleichung 4.16 aus dem Verhältnis der Intensitäten von Kreuz- und Diagonalsignal (Vuister & Bax, 1993) des HNHA-Experiments (Kapitel 4.19.3).

$$J^3(\text{HN}, \text{H}\alpha) = 1,05 \frac{1}{2\pi \cdot 12,3 \text{ ms}} \arctan \sqrt{-\frac{I_c}{I_d}} \quad (\text{Gleichung 4.16}),$$

I_c : Intensität des Kreuzsignals; I_d : Intensität des Diagonalsignals; Länge des Kohärenztransfers von HN zu H α : 12,3 ms; Korrekturfaktor: 1,05.

Für ein Protein der Größe von Proguanylin war eine Korrektur der berechneten Werte um etwa 5 % nötig, um die unterschiedlichen Relaxationraten der In-Phase- und Anti-Phase-Komponenten des HNHA Spektrums auszugleichen (Gleichung 4.16; Vuister & Bax, 1993; Kuboniwa *et al.*, 1994; Dux *et al.*, 1997).

Zusätzlich konnten einige $^3J(\text{HN}, \text{H}\alpha)$ Kopplungskonstanten aus einem hoch aufgelösten 2D-DQF-COSY Spektrum (Kapitel 4.19.3) durch Anpassen der Linienform der Anti-Phase-Dispersionssignale an eine Lorentz-Funktion bestimmt werden.

Wasserstoffbrückenbindungen

Von Amidprotonen, die 120 min nach dem Lösen von ^{15}N markiertem Proguanylin in D_2O noch ein detektierbares Signal im ^1H , ^{15}N -HSQC Spektrum zeigten, wurde eine Einbeziehung in eine Wasserstoffbrückenbindung angenommen. Der jeweilige Akzeptor wurde aus den anfänglichen Strukturen der iterativen Strukturbestimmung identifiziert, wenn bei mehr als 60 % der energieärmsten Strukturen der $\text{O}\cdots\text{H}-\text{N}$ Winkel größer als 120° und der Abstand zwischen Amidproton und Akzeptor-Sauerstoff $d(\text{N}-\text{H}\cdots\text{O}) < 2,3 \text{ \AA}$ war. Für jede gefundene Wasserstoffbrücke wurden jeweils die beiden folgenden Distanzbeschränkungen eingeführt: $d(\text{N}-\text{H}\cdots\text{O}) < 2,3 \text{ \AA}$ und $d(\text{N}\cdots\text{O}) < 3,3 \text{ \AA}$ (Kraulis *et al.*, 1989).

Residuale dipolare Kopplungen

Aufgrund der isotropen Bewegung von Molekülen in Lösung kommt es zu einer Auslöschung des Beitrags der anisotropen Wechselwirkung der dipolaren Kopplung. Um dennoch einen Beitrag der dipolaren Kopplung zu erhalten, wird daher eine Vorzugsorientierung der Moleküle benötigt, welche durch Verwendung von flüssigkristallinen Medien künstlich erzeugt werden kann. Diese Medien werden aufgrund ihrer großen magnetischen Suszeptibilität im statischen Magnetfeld orientiert und führen durch elektrostatische oder sterische Wechselwirkungen zu einer ungleichmäßigen Einschränkung der Bewegungsfreiheit der Moleküle um die verschiedenen Molekülachsen (Tjandra & Bax, 1997; Hansen *et al.*, 1998). Bei den orientierten Molekülen hängt die Größe der residualen dipolaren Kopplung

dann im Wesentlichen vom Abstand der beobachteten Kerne, ihrem gyromagnetischen Verhältnis und der Orientierung ihres Abstandsvektors bezüglich des äußeren Magnetfeldes ab (Gleichung 4.17; Tjandra & Bax, 1997).

$$D^{nm}(\Theta, \phi) = D_a \left[(3 \cos^2 \Theta - 1) + \frac{3}{2} R (\sin^2 \Theta \cos 2 \phi) \right] \quad (\text{Gleichung 4.17}),$$

D^{nm} : residuale dipolare Kopplung zwischen den Kernen n und m ; D_a : Axialkomponente des Orientierungstensors, der die Orientierung des externen Magnetfeldes relativ zu den willkürlich gewählten Achsen eines Molekülkoordinatensystems beschreibt; R : Rhombizität des Orientierungstensors; Θ, ϕ : Polarwinkel des Abstandsvektors der Kerne n und m bezüglich dem Koordinatensystem, in dem der Tensor diagonal ist.

Durch Messung von residualen dipolaren Kopplungen kann mit Hilfe von Gleichung 4.17 daher Information über die relative Orientierung der Bindungsvektoren eines Proteins bezüglich eines externen Koordinatensystems erhalten und als zusätzliche Information bei der Berechnung der dreidimensionalen Struktur eingesetzt werden (Kapitel 4.20.4; Clore *et al.*, 1998; Sass *et al.*, 2001).

4.20.3 Berechnung der Strukturen nach dem Prinzip des *simulated annealing* **Berechnung einer geometrisch korrekten Startstruktur**

Vor dem Beginn der Strukturberechnungen wurde eine Startstruktur mit einer korrekten lokalen Geometrie berechnet, bei der es sich im Wesentlichen um eine gestreckte Polypeptidkette handelt. Zunächst wurde mit dem XPLOR-Standardprotokoll "generate_structure.inp" (vgl. Protokoll „progua_psf.inp“ im Anhang) eine Strukturdatei (progua.psf) erstellt. Diese Datei enthält neben den Anordnungen der Atome in den Aminosäuren, die Atommassen und -ladungen, Bindungswinkel, Improperwinkel, sowie die vollständige Sequenz des Proteins. Die zugehörige Koordinatendatei (progua_template.pdb) wurde mit dem Protokoll "generate_template.inp" erstellt, das unter anderem auf die generierte psf-Datei zurückgreift.

Für alle 11 Prolinreste von Proguanylin wurde experimentell eine *trans*-Konformation verifiziert (Kapitel 5.1.5.2), die bei der Berechnung der geometrisch korrekten Startstruktur und allen weiteren Strukturberechnung fest vorgegeben wurde.

Simulated annealing

Die Moleküldynamik-Simulationen wurden nach dem Prinzip des *simulated annealing* durchgeführt. Das verwendete XPLOD-Protokoll "sa_1.inp" geht von der berechneten Startstruktur "progua_template.pdb" aus und bezieht außerdem Strukturparameter aus der "parallhdg.pro"-Datei. Die angewandte Energiefunktion war ein modifiziertes CHARMM-Potential, für die NOE-Abstandsbeschränkungen (Kapitel 4.20.2) wurde ein *soft-square-well*- und für die Beschränkung der dihedralen Winkel aus Kopplungskonstanten (Kapitel 4.20.2) ein harmonisches Potential verwendet. Um unwahrscheinliche Konformationen des Proteinrückgrats und der Seitenketten zu minimieren, wurde zusätzlich ein modifiziertes Datenbank-Potential (Kuszewski *et al.*, 1996; Kuszewski & Clore, 2000; Neudecker *et al.*, 2001) verwendet, dessen Energiefunktion die Häufigkeit einer bestimmten Konformation in hochaufgelösten Kristallstrukturen widerspiegelt.

Vor Beginn der Simulation wurde zunächst eine Energieminimierung nach dem *Conjugate Gradient*-Algorithmus (Powell, 1977) durchgeführt. Das folgende *simulated annealing* kann in drei Abschnitte gegliedert werden (Nilges, 1993) und beinhaltet eine automatische Zuordnung prochiraler Zentren (Folmer *et al.*, 1997) sowie eine teilweise Einschränkung nicht-kovalenter Wechselwirkungen zur Erhöhung der Effizienz (Nilges, 1993). Der erste Abschnitt umfaßte eine Simulation bei 2000 K über einen Zeitraum von 160 ps und wurde von zwei Abkühlphasen gefolgt. Während dem ersten Abkühlschritt wurde die Temperatur innerhalb von 120 ps auf 1000 K gesenkt und gleichzeitig die Kraftkonstanten für nicht-kovalente Wechselwirkungen und Winkelbeschränkungen auf ihren endgültigen Wert erhöht. In Gegenwart dieser hohen Kraftkonstanten wurde das System innerhalb von 60 ps weiter auf 100 K abgekühlt. In beiden Abkühlphasen betrug die Abkühlschrittweite jeweils 50 K. Bei dieser Vorgehensweise wird der Konformationsraum durch die verschiedenen Temperaturschritte deutlich besser abgesucht als bei einfachen Minimierungsalgorithmen, so daß auch lokale Minima der Energiefunktion überwunden werden können. Um im Anschluß an das *simulated annealing* möglichst das absolute Minimum der Energiefunktion zu erreichen, wurden abschließend zunächst 200 Energieminimierungsschritte nach Powell durchgeführt, denen weitere 1000 Minimierungsschritte ohne Datenbankterm folgten.

Ausgehend von den gleichen eingesetzten experimentellen Parametern (Abstandsbeschränkungen aus NOESY-Daten, Kopplungskonstanten und Wasserstoffbrückenbindungen) wurden die Rechnungen 45 bis 120 mal durchgeführt, so daß eine Schar von

Strukturen erhalten wurde (Benennung: „progua_XXX_*.pdb“; XXX = Datum der Rechnung, *= fortlaufende Nummer).

4.20.4 Verfeinerung der Strukturen mit dipolaren Kopplungen

Für Bereiche in der Proguanylin-Struktur mit geringer Flexibilität, d.h. einem $\{^1\text{H}\}^{15}\text{N}$ NOE $> 0,6$, wurden dipolare Kopplungen gemessen (Kapitel 4.19.3 und 4.20.2) und für eine Verfeinerung der bereits mit klassischen experimentellen Parametern (Kapitel 4.20.3) berechneten Strukturen verwendet. Dazu wurde die verwendete Energiefunktion um einen zusätzlichen Potentialterm der Form $E_{\text{dipolar}} = k_{\text{dipolar}} (D_{\text{calc}} - D_{\text{exp}})^2$ erweitert, um die dipolaren Kopplungen zu berücksichtigen. Eine Berechnung der dipolaren Kopplungen D_{calc} erfordert eine Bestimmung des Orientierungstensors bzw. der Axialkomponente D_a und Rhombizität R sowie der Orientierung des Molekülkoordinatensystems (x, y, z) relativ zum Koordinatensystem, in dem der Tensor diagonal ist. Eine genauere Bestimmung aller fünf Werte (D_a, R, x, y, z) entspricht einer Minimierung der Zielfunktion E_{dipolar} und kann durch anschließende Strukturberechnungen erfolgen. Dabei werden zunächst die Werte für Axialkomponente D_a und Rhombizität R anhand der starren Elemente der ohne residuale dipolare Kopplungen berechneten Strukturen abgeschätzt und konstant gehalten. Die anschließende Variation des Hauptachsensystems des Orientierungstensors entspricht einer Reduktion auf drei Unbekannte (x, y, z) während der Berechnungen. Das Hauptachsensystem kann dabei unterschiedliche Orientierungen mit unterschiedlicher Energie einnehmen und wird durch ein Pseudomolekül repräsentiert, das die gleiche Simulation durchläuft. Durch eine Serie von Simulationen mit separater Variation der Werte für D_a und R können diese, ausgehend von den anfänglich abgeschätzten Werten, genauer bestimmt werden (*grid search*; Clore *et al.*, 1998; Schweimer *et al.*, 2002).

Für die Verfeinerung der Proguanylin-Strukturen wurden die Tensorkomponenten mit der geringsten Abweichung zwischen experimentell bestimmten (D_{exp}) und berechneten (D_{calc}) dipolaren Kopplungen und geringstem Beitrag zur Gesamtenergie des Proteins verwendet. Dazu wurden aus einer Schar von 120 ohne dipolare Kopplungen berechneten Strukturen die 40 energieärmsten Strukturen ausgewählt, welche auch gleichzeitig die experimentellen Daten am besten erfüllten und als Startstrukturen für die anschließende Verfeinerung eingesetzt. Das verwendete XPLOR-Protokoll entsprach im Prinzip dem für die Bestimmung der Tensorkomponenten. Das *simulated annealing* umfaßte eine 5 ps Simulation bei 1000 K,

gefolgt von einer Abkühlphase, in der das System innerhalb von 10 ps mit 25 K-Schritten auf 300 K abgekühlt und die Kraftkonstante für die dipolaren Kopplungen auf ihren endgültigen Wert erhöht wurde.

Die verwendeten XPLOR-Protokolle für die Bestimmung von D_a und R (*grid search*; z.B. srg3grid_55_40.inp; srg3: Name der eingesetzten Strukturschar, grid: *grid search*, 55: Axialkomponente $D_a = 5,5$, 40: Rhombizität $R = 0,40$) und für die anschließende Verfeinerung der Strukturen (z.B. nih3GRID_55_40_final.inp) sind im Anhang wiedergegeben (Kapitel 10.2).

4.21 Komparative Molekülmodellierung

Zur Molekülmodellierung der extrazellulären Ligandenbindungsdomäne der Guanylatzyklase-C ($GC-C_{ECD}$) wurden die Programme SWISS-PDBViewer und SWISS-MODEL (Guex & Peitsch, 1997) des ExPASy Molecular Biology Servers (<http://www.expasy.org>) verwendet. Dabei wurde die bekannte Kristallstruktur der homologen dimeren Ligandenbindungsdomäne des ANP-Rezeptors (PDB Eintrag 1dp4) als Vorlage verwendet. Die experimentell bestimmten Disulfidbrücken (persönliche Mitteilung von Dr. Yuji Hidaka, Osaka, Japan) wurden mit dem Programm SYBYL (Version 6.5; Tripos Inc., St. Louis, USA) eingeführt und die Modellstrukturen anschließend energieminiert (100 Schritte mit dem Tripos-Kraftfeld in SYBYL).

Mit der Modellstruktur der $GC-C_{ECD}$ als Vorlage erfolgte die Molekülmodellierung von miniGC-C ebenfalls mit den oben genannten Programmen. Für die Einführung der Disulfidbrücke wurde wie oben beschrieben vorgegangen.

5. Experimente und Ergebnisse

5.1 Das humane Prohormon Proguanylin

5.1.1 Klonierungen

Um für die Strukturbestimmung eines Proteins mittels NMR Spektroskopie ausreichende Mengen eines rekombinanten Proteins zu erhalten, wird ein gutes Expressionssystem vorausgesetzt. Die Expression von rekombinantem Proguanylin sollte als Fusionsprotein mit Thioredoxin (Trx) in einem Thioredoxin-Reduktase-defizienten (*trx⁻*) *E. coli*-Stamm mit oxidativem Cytoplasma erfolgen, um die Ausbildung der drei nativen Disulfidbrücken des Prohormons zu ermöglichen.

Da nicht vorhersehbar war, welche Proteinase am ehesten für das Abspalten des Fusionspartners geeignet war, wurden parallel mehrere Klone für die Expression von rekombinantem Proguanylin hergestellt. Diese unterschieden sich ausschließlich in der Erkennungssequenz der jeweiligen Proteinase. Dementsprechend erfolgte die Benennung der konstruierten Vektoren pET-32a-EK-*proguanylin*, pET-32a-Xa-*proguanylin* und pET-32a-pres-*proguanylin* bzw. pET-32a-Asp-pres-*proguanylin* nach den Proteinasen Enterokinase (EK), Faktor Xa (Xa) und PreScission (pres). Alle Vektoren kodieren somit für Proguanylin-Fusionsproteine, die neben den NH₂-terminalen 109 Aminosäuren des Thioredoxin-Fusionspartners eine 46 Aminosäuren umfassende Linkerregion mit sechs Histidinresten (His₆-tag) sowie eine Erkennungssequenz für jeweils eine der genannten Proteinasen enthalten.

5.1.1.1 pET-32a-EK-*proguanylin* und pET-32a-Xa-*proguanylin*

Die von Dr. Jürgen Mägert (IPF PharmaCeuticals, Hannover) zur Verfügung gestellten Plasmid-DNAs pGEM-T-EK-*proguanylin* und pGEM-T-Xa-*proguanylin* wurden jeweils gleichzeitig mit *Bgl*III und *Nco*I verdaut (Kapitel 4.7.1) und der gesamte Restriktionsansatz mittels Agarosegelelektrophorese (1,5 % Agarose; Kapitel 4.3.1) getrennt. Anschließend wurde die dem Proguanylin-Gen entsprechende Bande extrahiert (Kapitel 4.6.3). pET-32a wurde ebenfalls mit *Bgl*III und *Nco*I verdaut (Kapitel 4.7.1) und nach Entfernen der Restriktionsendonukleasen und Pufferwechsel (Kapitel 4.6.2) mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert (Kapitel 4.7.2), um die Religation der Vektor-DNA weitgehend zu verhindern. Nach erneutem Pufferwechsel wurde der so behandelte Vektor mit der EK- bzw.

Xa-*proguanylin*-DNA ligiert (Kapitel 4.7.3) und nach Butanolfällung (Kapitel 4.6.1) durch Elektrotransformation (Kapitel 4.9.2) in kompetente *E. coli* Top10-Zellen (Kapitel 3.1.1) eingebracht. Mehrere Transformanten wurden mit Kolonie-PCR (Kapitel 4.8.1) auf ein inseriertes EK- bzw. Xa-*proguanylin*-Gen hin untersucht. Als Primer dienten die zu den 5'- und 3'-Enden des Proguanylin-Gens komplementären Oligonukleotide progua_EK_5' bzw. progua_Xa_5' und progua_3' (Kapitel 3.3).

Die Plasmid-DNA einer so überprüften Transformanten-Kolonie wurde isoliert (Kapitel 4.5) und die korrekte Nukleotidsequenz durch Sequenzierung bestätigt (Kapitel 4.7.4). Die Nukleotidsequenzen sind im Anhang (Kapitel 10.1.2, 10.1.3) wiedergegeben.

5.1.1.2 pET-32a-pres-*proguanylin* und pET-32a-Asp-pres-*proguanylin*

Das Gen für Proguanylin wurde mittels Linker-PCR (Kapitel 4.8.2) am 5'-Ende mit einer für die Erkennungssequenz der PreScission-Proteinase kodierenden Sequenz sowie einer *Bgl*II-Schnittstelle und am 3'-Ende mit einer *Nco*I-Schnittstelle versehen. Als Matrize diente dabei das Plasmid pET-32a-EK-*proguanylin* (Kapitel 3.2), als Primer wurden die zum 5'- bzw. 3'-Ende des Proguanylin-Gens komplementären Oligonukleotide pres-progua_5' bzw. asp-pres-progua5' (enthält am 5'-Ende zusätzlich eine für fünf Aspartatreste kodierende Sequenz) und progua_3' verwendet (Kapitel 3.3). Der PCR-Ansatz wurde mittels Agarosegelelektrophorese (Kapitel 4.3.1) getrennt, die dem pres-*proguanylin*- bzw. Asp-pres-*proguanylin*-Gen entsprechende Bande extrahiert (Kapitel 4.6.3) und gleichzeitig mit *Bgl*II und *Nco*I restringiert (Kapitel 4.7.1). Nach Ligation (Kapitel 4.7.3) in doppelt verdauten, dephosphorylierten pET-32a und Butanolfällung (Kapitel 4.6.1) wurden kompetente *E. coli* Top10-Zellen (Kapitel 3.1.1) mit der ligierten DNA durch Elektroporation (Kapitel 4.9.2) transformiert und auf Agarplatten mit Ampicillin (100 µg/ml) ausplattiert. Nach Kolonie-PCR (Primer: Oligonukleotide pres-progua_5' bzw. asp-pres-progua5' und progua_3') der *E. coli* Top10-Transformanten wurde die richtige Nukleotidsequenz durch Sequenzierung (Kapitel 4.7.4) bestätigt (vgl. Kapitel 10.1.4, 10.1.5).

Die Expression aller Trx-Proguanylin-Fusionsproteine erfolgte in *E. coli* AD494(DE3)-Zellen.

5.1.2 Expression in *E. coli* AD494(DE3)

Die die unterschiedlichen Expressionsvektoren (Kapitel 5.1.1) enthaltenden Bakterienstämme wurden auf die durch IPTG induzierbare Expression der verschiedenen Fusionsproteine hin überprüft (Kapitel 4.11.1). Dazu wurde jeder Stamm in 50 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin und 15 µg/ml Kanamycin bei 37 °C geschüttelt (200 rpm) und bei einer OD₆₀₀ von 0,7 bis 0,8 durch Zugabe von IPTG zu einer Endkonzentration von 1 mM induziert. Für die weitere Inkubation wurde die Temperatur auf 30 °C gesenkt. Die Bildung der Fusionsproteine wurde durch elektrophoretische Analyse (Kapitel 4.3.2) von vor und nach Induktion entnommenen Zellen untersucht (Abb. 5.1).

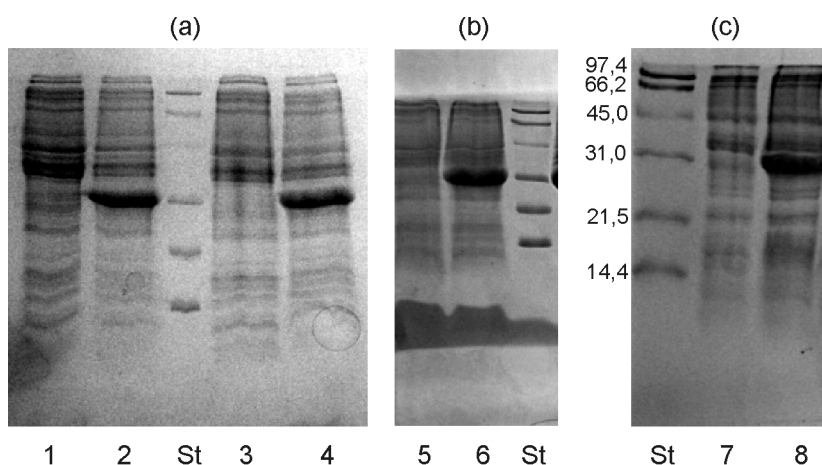


Abbildung 5.1: Expressionsversuche von Proguanylin als Thioredoxin-Fusionsprotein in *E. coli* AD494(DE3). Jeweils vor und nach Induktion entnommene Zellen sind analysiert (Kapitel 4.11.1). Die überexprimierten Fusionsproteine unterscheiden sich in den Erkennungssequenzen für die Proteinasen Enterokinase

((a), Bahnen 1+2), Faktor Xa ((a), Bahnen 3+4) und PreScission ((b) und (c)). Das in (c) überexprimierte Fusionsprotein (Trx-Asp-Pres-Proguanylin) besitzt vor der PreScission-Spaltstelle zusätzlich fünf Aspartatreste. Bahnen 1, 3, 5 und 7 sind jeweils vor, Bahnen 2, 4, 6 und 8 sind jeweils 3 h nach Induktion. St: *low range*-Proteinstandard (in kDa bei (c)).

Nach Induktion ist bei allen Klonen das Auftauchen von Proteinbanden mit einem apparenten Molekulargewicht von etwa 29 kDa zu sehen (Abb. 5.1). Da sich die Fusionsproteine ausschließlich in der Erkennungssequenz für die genannten Proteinasen unterscheiden (Kapitel 5.1.1), besitzen sie fast identische Molekulargewichte, die theoretisch zu 27,3 kDa für Trx-EK-Proguanylin, 27,2 kDa für Trx-Xa-Proguanylin, 27,6 kDa für Trx-Pres-Proguanylin und 28,1 kDa für Trx-Asp-Pres-Proguanylin berechnet werden können. Diese Unterschiede sind für eine Differenzierung bei der SDS-Gelelektrophorese (Kapitel 4.3.2) nicht ausreichend, so daß die nach Induktion auftauchenden Proteinbanden bei allen Varianten ein identisches apparentes Molekulargewicht aufweisen (Abb. 5.1).

Die hohen Expressionsraten bei allen Klonen bestätigten die Eignung des gewählten Systems

für die rekombinante Expression von Proguanylin als Thioredoxin-Fusionsprotein.

5.1.3 Reinigung von rekombinantem Proguanylin

Um ausreichende Mengen an rekombinantem Proguanylin gewinnen zu können, wurden Zellen in Volumina von 1 bis 4,5 l LB-Medium in Schüttelkolben (Kapitel 4.11.2) herangezogen und durch Zentrifugation (15 min, 6000 rpm, 4 °C) geerntet. Die Zellen wurden in Aufschlußpuffer resuspendiert und aufgeschlossen (Kapitel 4.12.1). Nach dem Entfernen von Zelltrümmern durch Zentrifugation (35 min, 13000 rpm, 4 °C) konnte der erhaltene zellfreie Extrakt direkt für eine Affinitätschromatographie zur Gewinnung der Fusionsproteine eingesetzt werden (Kapitel 4.12.2).

5.1.3.1 Zellaufschluß

Bei der Expression von Proguanylin war die korrekte Ausbildung der Disulfidverbrückung von Bedeutung. Um eine Reinigung der Fusionsproteine aus Einschlußkörperchen und eine damit verbundene Reduktion von Disulfidbrücken zu vermeiden, wurde ausschließlich der lösliche Überstand nach Zellaufschluß verwendet. Der Anteil der exprimierten Fusionsproteine sollte in diesen zellfreien Extrakten daher möglichst groß sein. Ein Vergleich der elektrophoretischen Analysen (Kapitel 4.3.2) der Rohextrakte und Zelltrümmer nach Zellaufschluß zeigte für die unterschiedlichen Varianten jedoch deutliche Differenzen im löslichem Anteil der Thioredoxin-Fusionsproteine (Abb. 5.2).

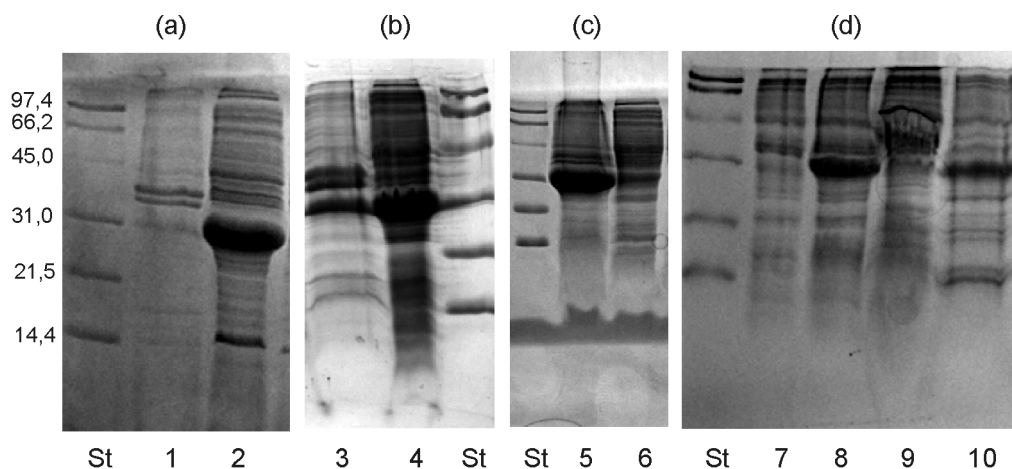


Abbildung 5.2: Elektrophoretische Analyse (Kapitel 4.3.2) der Zellaufschlüsse von *E. coli* AD494(DE3)-Zellen nach Expression der Thioredoxin-Fusionsproteine Trx-EK-Proguanylin (a), Trx-Xa-Proguanylin (b), Trx-Pres-Proguanylin (c) und Trx-Asp-Pres-Proguanylin (d). Bahnen 1, 3, 5 und 9: Zelltrümmer; Bahnen 2, 4, 6 und 10: Rohextrakt; Bahn 7: vor Induktion; Bahn 8: 3 h nach Induktion; St: *low range*-Proteinstandard (in kDa bei (a)).

Während nach dem Aufschluß von *E. coli* AD494(DE3)/pET-32a-EK-*proguanylin* deutlich mehr als 90 % des exprimierten Fusionsproteins im Rohextrakt zu finden war (Abb. 5.2 (a), Bahn 2), konnte für *E. coli* AD494(DE3)/pET-32a-Xa-*proguanylin* und AD494(DE3)/pET-32a-pres-*proguanylin* eine deutliche Zunahme des Anteils an Fusionsproteinen in der unlöslichen Fraktion nach Zellaufschluß beobachtet werden (Abb. 5.2 (b) und (c), Bahnen 3+5). Im Fall von Trx-Pres-Proguanylin kam es sogar zur Aggregation und zur Ausfällung des Fusionsproteins aus dem löslichen Überstand, so daß dieses Konstrukt zunächst nicht für die Expression von Proguanylin geeignet erschien.

Die Fusionsproteine unterschieden sich ausschließlich in der jeweiligen Proteinase-Erkennungssequenz (EK: DDDDK↓; Xa: IEGR↓; PreScission: LEVLFQ↓GP), deren Polarität in der angegebenen Reihenfolge abnimmt. Daher war ein Zusammenhang zwischen der Polarität der Erkennungssequenz und der Löslichkeit der Fusionsproteine naheliegend. Dieser Einfluß wurde ausgenutzt, um die Löslichkeit von Trx-Pres-Proguanylin zu beeinflussen: Die Ladungsdichte in der direkten sequentiellen Umgebung der PreScission-Spaltstelle wurde durch Klonierung von fünf Aspartatresten unmittelbar vor diese erhöht. Nach Zellaufschluß war deutlich mehr als 90 % des resultierenden Fusionsproteins Trx-Asp-Pres-Proguanylin im Rohextrakt in löslicher Form zu finden (Abb. 5.2 (d), Bahn 10).

5.1.3.2 Reinigung der Fusionsproteine

Um die Bindungsfähigkeit der Fusionsproteine an das TALONTM-Säulenmaterial und das Elutionsverhalten unspezifisch gebundener zellulärer Proteine zu prüfen, wurde die Elution zu Beginn mit Puffern langsam steigender Imidazolkonzentration durchgeführt. Die dokumentierte Vorgehensweise stellt die jeweils gefundenen optimalen Bedingungen dar.

Nach Aufschluß (Kapitel 4.12.1) der unterschiedlichen Expressionsvektoren (Kapitel 5.1.1) enthaltenen *E. coli* AD494(DE3)-Zellen wurden die erhaltenen Rohextrakte wie in Kapitel 4.12.2 beschrieben auf eine in Auftragspuffer äquilibrierte TALONTM-Säule (Clontech, Heidelberg) aufgetragen (Abb. 5.3).

In den Säulendurchbrüchen (Abb. 5.3, Bahnen 3, 10 und 16) waren keine Fusionsproteine enthalten, und die meisten zellulären Proteine konnten durch Waschen mit Auftragspuffer von der Säule verdrängt werden (Abb. 5.3, Bahnen 4, 11 und 17). Trx-EK-Proguanylin (Bahnen 5-8), Trx-Xa-Proguanylin (Bahnen 12-15) und Trx-Pres-Proguanylin (Bahnen 18+19) wurden zusammen mit sehr wenigen Verunreinigungen durch Elutionspuffer von der Säule

gewaschen.

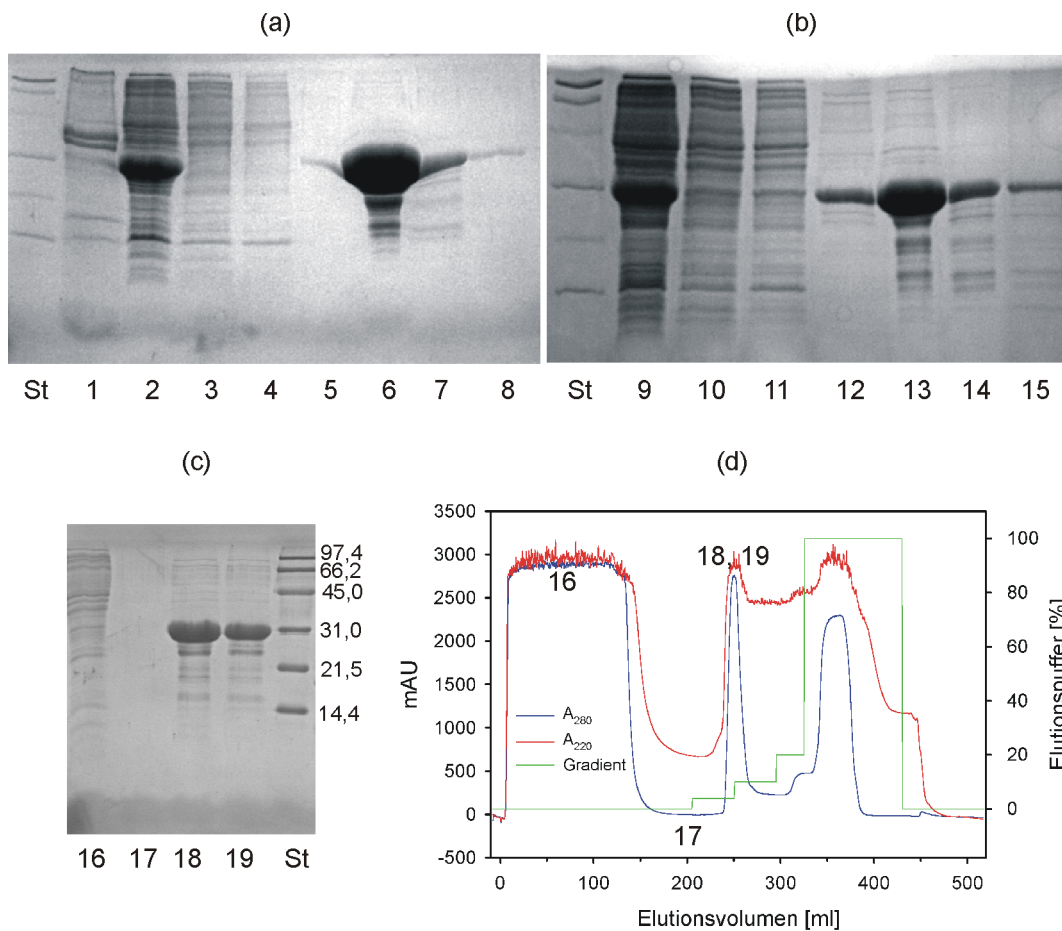


Abbildung 5.3: Co^{2+} -Ionen-Affinitätschromatographie (Kapitel 4.12.2) der aus *E. coli* AD494(DE3)/pET-32a-EK-proguanylin (a), *E. coli* AD494(DE3)/pET-32a-Xa-proguanylin (b) und *E. coli* AD494(DE3)/pET-32a-pres-proguanylin (c, d) gewonnenen Rohextrakte. Alle Fusionsproteine konnten jeweils zusammen mit wenigen Verunreinigungen von der Säule eluiert werden (19 %-ige SDS-Gele; Bahnen 5-8, 12-15, 18+19). Als Beispiel ist das Chromatogramm der Reinigung von Trx-Pres-Proguanylin mit den den Gelbahnen entsprechenden Fraktionen gezeigt (d). Bahn 1: Zelltrümmer; Bahnen 2+9: Rohextrakte; Bahnen 3, 10, 16: Säulendurchfluß; Bahnen 4, 11, 17: Waschen mit Auftragspuffer; St: *low range*-Proteinstandard (bei (c) in kDa).

5.1.3.3 Behandlung der Fusionsproteine mit Proteinasen

Die gereinigten Fusionsproteine wurden entsprechend ihrer Erkennungssequenz mit jeweils einer der Proteinase Enterokinase, Faktor Xa und PreScission in Lösung gespalten (Kapitel 4.13.1). Die elektrophoretischen Analysen der vor und nach Spaltung entnommenen Proben aller Trx-Fusionsproteine sind in Abbildung 5.4 zusammengestellt.

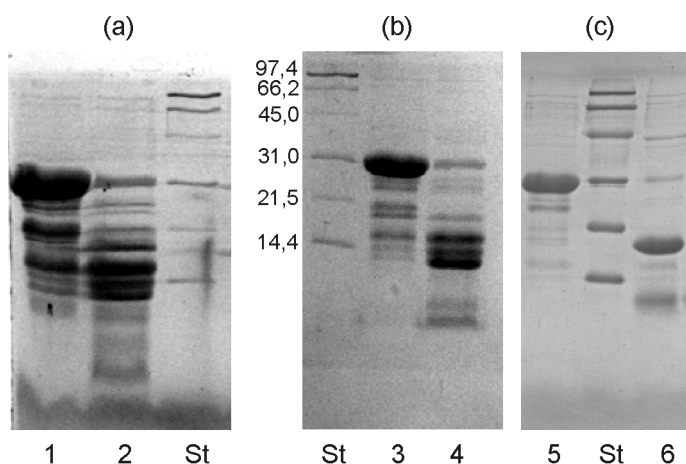


Abbildung 5.4: 19 %-ige SDS-Gele der Spaltungen von Trx-EK-Proguanylin mit Enterokinase (a), Trx-Xa-Proguanylin mit Faktor Xa (b) und Trx-Pres-Proguanylin mit PreScission (c) in Lösung. Nach Spaltung war in allen Fällen eine deutliche Abnahme der Fusionsproteinbande (jeweils etwa 28 kDa) zu sehen. Bei den Banden mit 17 kDa und 10 kDa handelte es sich um den Thioredoxin/Histidin-Anhang und

Proguanylin (bei Spaltung von Trx-Pres-Proguanylin (c) durch Pfeile markiert). Nach Spaltung mit Enterokinase bzw. Faktor Xa (a, b) sind eine Reihe weiterer Banden zu sehen, die sekundären Spaltprodukten entsprachen. Bahnen 1, 3, 5: vor der Spaltung; Bahnen 2, 4, 6: nach Spaltung; St: *low range*-Proteinstandard (bei (b) in kDa).

Nach beendeter Spaltung konnte in allen Fällen eine deutliche Intensitätsabnahme der Fusionsproteinbanden (je etwa 28 kDa) beobachtet werden (Abb. 5.4, Bahnen 2, 4, 6), während die Produkte bei der Behandlung mit den unterschiedlichen Proteinasen sehr heterogen waren.

Die höchste Spezifität und Effizienz der Spaltung war bei Verwendung der PreScission-Proteinase zu verzeichnen (Abb. 5.4 (c)): Bei den Spaltprodukten handelte es sich fast ausschließlich um die erwünschten Produkte, den Thioredoxin/Histidin-Anhang (17,1 kDa) und rekombinantes Proguanylin (10,5 kDa) (Abb. 5.4, Bahn 6, durch Pfeile gekennzeichnet). Im Gegensatz dazu resultierte die Spaltung mit Enterokinase (Abb. 5.4 (a)), bzw. Faktor Xa (Abb. 5.4 (b)) in etlichen zusätzlichen Produkten mit Molekulargewichten zwischen 14 und 17 kDa, sowie in sehr kleinen Fragmenten (deutlich < 10 kDa; Abb. 5.4, Bahnen 2+4), die auf sekundäre Spaltungen zurückzuführen waren.

5.1.3.4 Isolierung von Proguanylin ohne Fusionspartner

Der Thioredoxin-Anhang und eventuell ungespaltenes Fusionsprotein enthalten noch die Hexahistidinsequenz und können daher über eine erneute Chromatographie an einer TALON™-Säule von rekombinantem Proguanylin abgetrennt werden. Da nicht bekannt war, welche der durch Spaltung mit Enterokinase oder Faktor Xa entstandenen sekundären Spaltprodukte (Abb. 5.4, Bahnen 2+4) noch die Hexahistidinsequenz besaßen, wurde zunächst jeder Spaltansatz erneut auf eine in Auftragspuffer äquilibrierte TALON™-Säule

aufgetragen (Kapitel 4.13.2; Abb. 5.5).

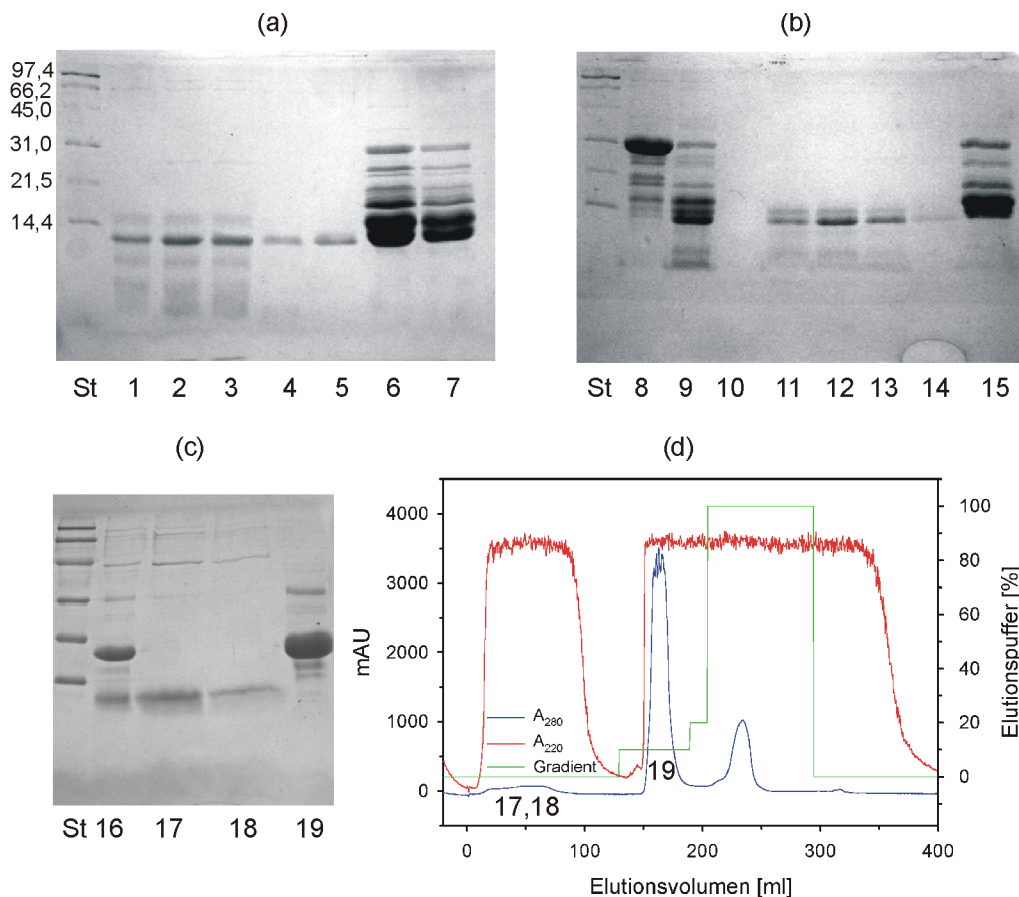


Abbildung 5.5: Elektrophoretische Analyse (Kapitel 4.3.2) der Co^{2+} -Ionen-Affinitätschromatographien nach Proteinase-Behandlung von Trx-EK-Proguanylin (a), Trx-Xa-Proguanylin (b) und Trx-Pres-Proguanylin (c) (Kapitel 5.1.3.3). Ungespaltene Proteine und Trx-tag wurden an die Säule gebunden (Bahnen 6, 7, 15, 19), während Proguanylin (zusammen mit sekundären Spaltprodukten bei (a) und (b)) im Durchbruch und in den Waschfraktionen enthalten war (Bahnen 1-5, 10-14, 17+18). Als Beispiel ist das Chromatogramm nach Auftrag des PreScission-Spaltansatzes gezeigt (d). Bahn 8: vor der Spaltung; Bahnen 9+16: nach Spaltung; Bahnen 6, 7, 15, 19: Waschen mit Elutionspuffer; St: *low range*-Proteinstandard (bei (a) in kDa).

Bei der elektrophoretischen Analyse der gesammelten Fraktionen war für alle eingesetzten Spaltansätze eine intensive Bande für Proguanylin im Säulendurchfluß und in den Waschfraktionen zu sehen (Abb. 5.5, Bahnen 1-5, 10-14, 17+18), alle größeren Spaltfragmente (incl. Trx-tag) und das ungespaltene Fusionsprotein konnten vollständig von Proguanylin getrennt und durch Elutionspuffer von der Säule gewaschen werden (Abb. 5.5, Bahnen 6, 7, 15, 19).

Je nach Vorbehandlung gab es jedoch deutliche Unterschiede in der Reinheit des nach diesem Schritt erhaltenen Proteins: Während nach der Behandlung mit PreScission neben Proguanylin nur sehr geringe Mengen hochmolekularer Verunreinigungen enthalten waren

(Abb. 5.5, Bahnen 17+18), konnten die bei der Spaltung mit Enterokinase oder Faktor Xa entstandenen sekundären Spaltprodukte mit Molekulargewichten kleiner 10 kDa und etwa 15 kDa durch diesen Chromatographie-Schritt nicht abgetrennt werden. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde daher auf die Expression von Proguanylin als Thioredoxin-Fusionsprotein mit Enterokinase- oder Faktor Xa-Spaltstelle verzichtet.

Nach der Spaltung von Trx-Pres-Proguanylin mit PreScission wurden der Proguanylin-haltige Durchbruch und die Waschfraktionen der Co^{2+} -Ionen-Affinitätschromatographie (Abb. 5.5 (c), (d)) vereinigt. Das dialysierte und lyophilisierte Protein (Kapitel 4.13.2) wurde als Proguanylin identifiziert und weiter charakterisiert (Kapitel 5.1.4) und konnte für die Strukturbestimmung mittels NMR Spektroskopie eingesetzt werden (Kapitel 5.1.5). Bei Verwendung von *E. coli* AD494(DE3)/pET-32a-Asp-pres-proguanylin zur rekombinanten Expression von Proguanylin wurde durch die gegenüber Trx-Pres-Proguanylin deutlich erhöhte Löslichkeit von Trx-Asp-Pres-Proguanylin eine bessere Ausbeute erzielt. Diese lag zwischen 4 mg und 7 mg an rekombinantem Proguanylin je Liter Bakterienkultur (entsprechend 2,5-3 g Naßzellgewicht). Aufgrund der Spezifität der verwendeten PreScission-Proteinase besitzt das auf diese Weise erhaltene rekombinante Proguanylin im Vergleich zum natürlichen, in menschlichem Hämofiltrat vorkommenden Protein jedoch eine zusätzliche Gly-Pro-Sequenz am NH_2 -Terminus.

5.1.3.5 Isotopenmarkierung

Für die Markierung von rekombinantem Proguanylin mit den NMR-aktiven Isotopen ^{15}N und ^{13}C wurde *E. coli* AD494(DE3)/pET-32a-Asp-pres-proguanylin auf ^{15}N bzw. $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ markiertem M9-Minimalmedium herangezogen (Kapitel 4.11.2). Da *E. coli* AD494(DE3)-Zellen nicht zur Biosynthese von Leucin in der Lage sind, wurde bei der Anzucht auf isotopenmarkiertem M9 Minimalmedium ^{15}N L-Leucin zugesetzt (Kapitel 3.1.2). Die Reinigung der markierten rekombinanten Proteine erfolgte dann analog zum unmarkierten Protein (Kapitel 5.1.3). Im Anschluß an die beschriebene Reinigung wurde zusätzlich eine präparative RP-HPLC durchgeführt (Kapitel 4.13.3), um für die Durchführung der dreidimensionalen NMR-Experimente eine möglichst große Reinheit der Proteinprobe zu gewährleisten. Nach diesem Reinigungsschritt waren die Ausbeuten bei der Anzucht auf Minimalmedium mit etwa 3-6 mg an markiertem rekombinantem Proguanylin je Liter Bakterienkultur etwas geringer als für das unmarkierte Protein (vgl. Kapitel 5.1.3.4).

5.1.4 Charakterisierung von Proguanylin

Die Aminosäuresequenz (GPVTVQDGNFSFSLE-) von rekombinantem Proguanylin wurde durch NH₂-terminale Sequenzierung (Dr. Axel Schulz, IPF PharmaCeuticals, Hannover) bestätigt.

5.1.4.1 Massenspektrometrie

Für die Bestimmung des Molekulargewichts wurden Massenspektren (Kapitel 4.16) von rekombinantem Proguanylin aufgenommen (Abb. 5.6).

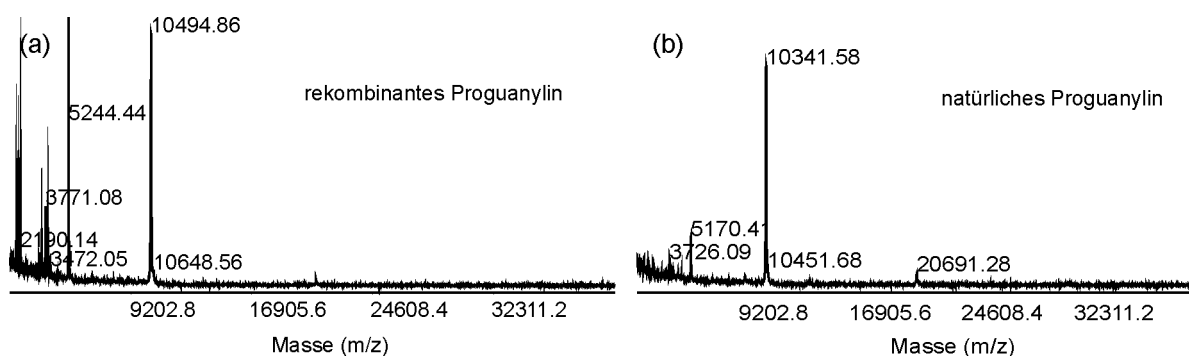


Abbildung 5.6: MALDI-TOF-Massenspektren (Kapitel 4.16) von rekombinantem ((a), $M^+ = 10495$ Da) und natürlichem ((b), $M^+ = 10341$ Da) Proguanylin. Die molekulare Masse von rekombinantem Proguanylin ist aufgrund der zusätzlichen NH₂-terminalen Gly-Pro-Sequenz um 154 Da größer als die des natürlichen Proteins.

Rekombinantes Proguanylin hatte eine Masse von 10495 Da (Abb. 5.6, (a)), die 4 Da über dem theoretisch berechneten Wert bei ausgebildeter Disulfidverbrückung lag. Da für das natürliche, in menschlichem Hämofiltrat vorkommende Protein (theoretische M: 10337 Da) ebenfalls ein um 4 Da zu großer Wert gemessen wurde (Abb. 5.6, (b)), kann auch für das rekombinante Protein die Ausbildung aller Disulfidbrücken angenommen werden. Die beobachteten Differenzen zu den theoretischen Werten sind daher auf eine ungenaue Referenzierung des Massenspektrometers zurückzuführen. Die Differenzen der Molekulargewichte von rekombinantem und natürlichem Proguanylin (Abb. 5.6) resultieren aus der zusätzlichen Gly-Pro-Sequenz am NH₂-Terminus des rekombinanten Proteins.

5.1.4.2 Kapillarzonelektrophorese und RP-HPLC

Die Reinheit des rekombinant hergestellten Proteins konnte durch analytische Methoden, wie der Kapillarzonelektrophorese (Kapitel 4.3.3) und der analytischen RP-HPLC (Kapitel 4.13.3), nachgewiesen werden (Abb. 5.7, (b, e)).

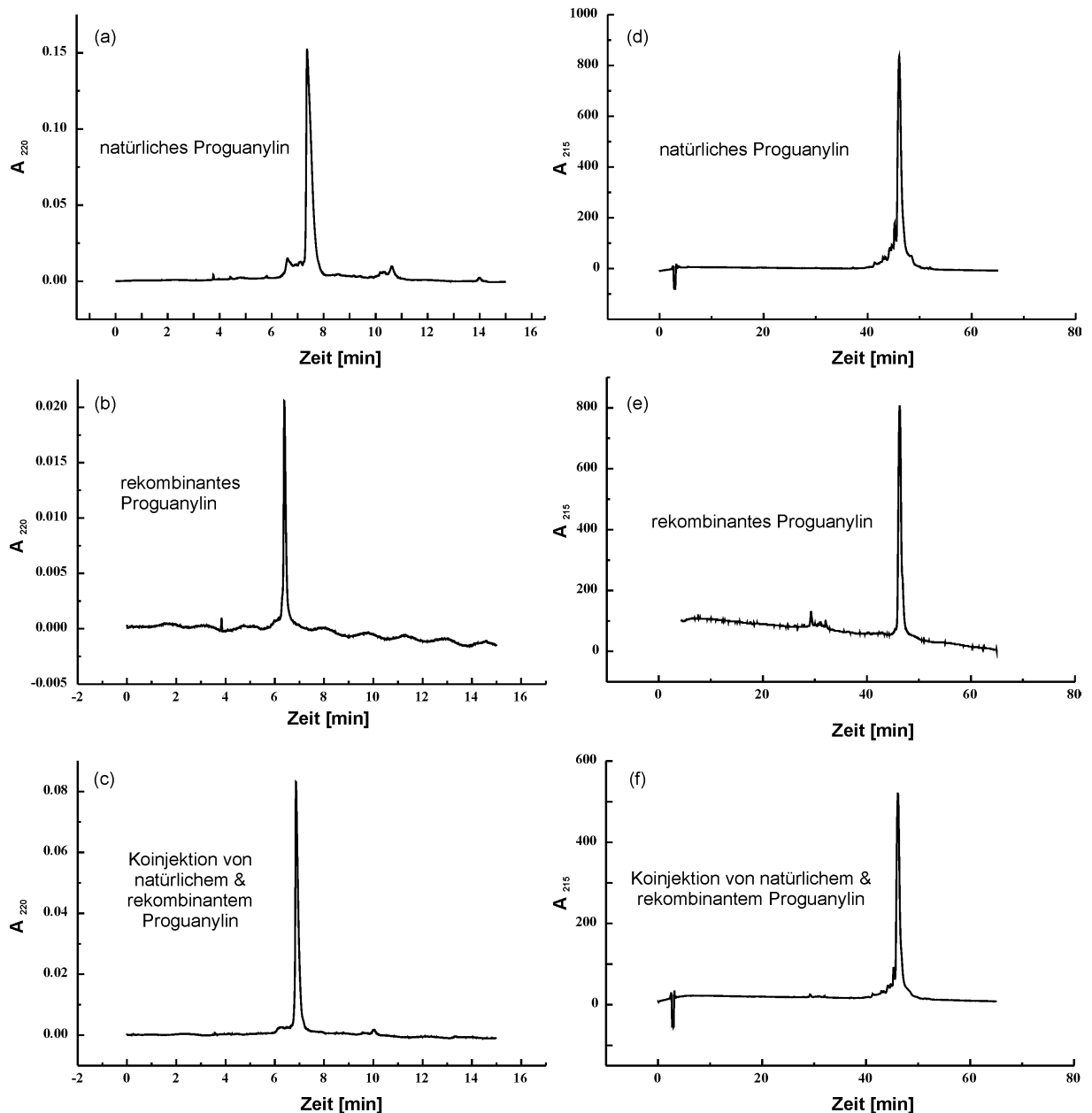


Abbildung 5.7: Elektropherogramme (Kapitel 4.3.3; (a)-(c)) und Chromatogramme (Kapitel 4.13.3; (d)-(f)) von rekombinantem (b, e) und natürlichem (a, d) Proguanylin. Das Laufverhalten bei Koinjektion beider Proteine (c, f) war bei beiden Methoden identisch (Retentionszeiten: 6,39 min bei CZE; 46,33 min bei RP-HPLC).

Rekombinantes Proguanylin zeigte bei beiden Analysemethoden ein mit dem natürlichen, aus menschlichem Hämofiltrat isolierten Protein (IPF PharmaCeuticals, Hannover; Abb. 5.7, (a, d)) übereinstimmendes Elutionsverhalten, obwohl es am NH_2 -Terminus zwei zusätzliche Aminosäuren besitzt. Dieser Hinweis auf die gleichen biophysikalischen Eigenschaften der beiden Proteine konnte durch Koinjektion bestätigt werden: sowohl bei der Kapillarzonelektrophorese als auch bei der RP-HPLC eluierten natürliches und rekombinantes Proguanylin gemeinsam in einem einzigen Peak (Abb. 5.7, (c, f)).

5.1.4.3 Nachweis der nativen Disulfidverbrückung

Schulz *et al.* (1999) konnten zeigen, daß im Gegensatz zum Guanylin-Prohormon ein eindeutiger Nachweis der Disulfidverbrückung für biologisch aktives Guanylin mittels analytischer RP-HPLC möglich ist. Somit erfordert der Nachweis der Disulfidverbrückung von Proguanylin mittels RP-HPLC eine Freisetzung von biologisch aktivem Guanylin (Proguanylin Reste 80-94). Proguanylin besitzt eine labile Asp79-Pro80-Bindung, welche durch Behandlung mit Essigsäure hydrolysiert werden kann (Kowit & Maloney, 1982; Rittenhouse & Marcus, 1984), so daß das aktive Fragment für eine anschließende Analyse zur Verfügung steht (Schulz *et al.*, 1999; Kapitel 4.14).

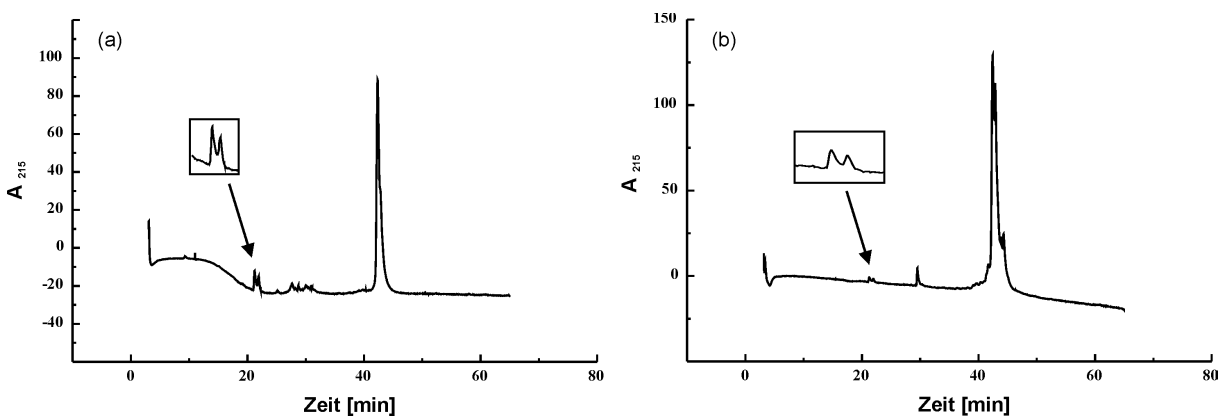


Abbildung 5.8: RP-HPLC-Untersuchungen nach Essigsäure-Spaltung (Kapitel 4.14) von rekombinantem (a) und natürlichem (b) Proguanylin. Das biologisch aktive Guanylin (Proguanylin Reste 80-94) wird durch saure Hydrolyse der labilen Asp79-Pro80-Bindung von Proguanylin freigesetzt und führt zu einem charakteristischen Doppelpeak im Chromatogramm (vergrößerte Bereiche).

Führt man die analytische RP-HPLC mit einer gekühlten Säule durch (Kapitel 4.13.3, 4.14), können die beiden topologischen Guanylin-Isomere (Kapitel 1.3.2) aufgelöst und im Chromatogramm als charakteristischer Doppelpeak identifiziert werden (Abb. 5.8 (b); Klodt *et al.*, 1997; Schulz *et al.*, 1999). Für das Produkt der Essigsäure-Spaltung von rekombinantem Proguanylin wurde ebenfalls dieses charakteristische Elutionsprofil beobachtet (Abb. 5.8, (a)). Da Fragmente mit einer inaktiven Disulfidverbrückung ein deutlich abweichendes Elutionsverhalten zeigen, konnte daher für das aus rekombinantem Proguanylin freigesetzte Fragment die native und biologisch aktive 1-3/2-4 Disulfidverbrückung bestätigt werden (entspricht Cys83 – Cys91, Cys86 – Cys94 der Prohormonsequenz) und somit indirekt auch die von Proguanylin (Cys48 – Cys61, Cys83 – Cys91, Cys86 – Cys94). Die Prosequenzen von natürlichem und rekombinantem Proguanylin

koeluierten jeweils mit eventuell ungespaltenem Prohormon, so daß nach saurer Hydrolyse kein separater Peak für die Prosequenz im Chromatogramm beobachtet werden konnte (Abb. 5.8).

5.1.4.4 Nachweis der biologischen Aktivität

Als Maß für die biologische Aktivität von rekombinantem Proguanylin wurde die intrazelluläre Bildung des *second messengers* cGMP nach Stimulation von T84 Zellen mit Proguanylin bzw. Proguanylin-Hydrolysat verwendet (Abb. 5.9; Kapitel 4.14). T84-Zellen exprimieren von den bekannten Guanylatzyklasen ausschließlich den Rezeptor der Peptidhormone Guanylin und Uroguanylin, die Guanylatzyklase-C (Singh *et al.*, 1991). Der durch Rezeptoraktivierung resultierende intrazelluläre Anstieg der cGMP-Konzentration kann daher als ein indirektes, aber spezifisches Maß für die Aktivierung der GC-C und für das Aktivierungspotential der eingesetzten Liganden verwendet werden (Currie *et al.*, 1992).

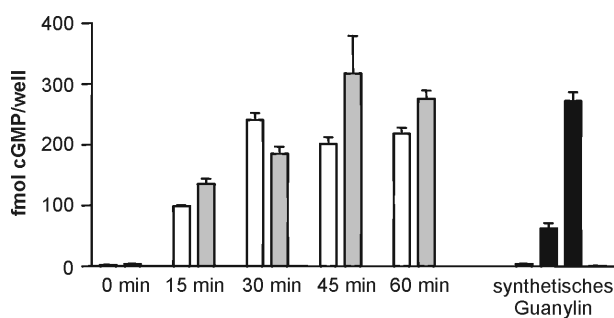


Abbildung 5.9: Produktion von intrazellulärem cGMP nach Stimulation von T84-Zellen mit natürlichem (weiße Balken) und rekombinantem (graue Balken) Proguanylin (Kapitel 4.15). Erst durch Inkubation mit Essigsäure (15, 30, 45 und 60 min) kann die cGMP-Bildung beobachtet werden. Zum Vergleich ist die Aktivität von synthetischem

Guanylin mit selektiv eingeführten Disulfidbrücken (schwarze Balken) gezeigt. Eingesetzte Konzentrationen: ~ 1 μ M Proguanylin; 0,01, 0,1 und 1 μ M Guanylin (Kapitel 4.15).

Die Inkubation von T84-Zellen mit natürlichem, in menschlichem Hämofiltrat vorkommendem Proguanylin führte lediglich zur Bildung von vernachlässigbaren Mengen an intrazellulärem cGMP (Abb. 5.9, weiße Balken, 0 min; Kapitel 4.15). Diese bereits in der Literatur beschriebene fehlende biologische Aktivität von Proguanylin (Schulz *et al.*, 1999) wurde ebenfalls für das rekombinante Protein beobachtet (Abb. 5.9, graue Balken, 0 min). Erst die Hydrolyse von natürlichem und rekombinantem Proguanylin mit Essigsäure (Kapitel 4.14) führte zur Bildung von Produkten ähnlicher biologischer Aktivität und durch die Stimulation der T84-Zellen zur Produktion von intrazellulärem cGMP (Abb. 5.9, 15-60 min). Wie aus der Zunahme des cGMP-Spiegels in den Zellen bei zunehmender Dauer der vorausgehenden Essigsäure-Behandlung hervorgeht (Abb. 5.9, graue und weiße Balken), war

diese maßgebend für die Menge des gebildeten GC-C-Liganden. Eine 30- bis 45-minütige Hydrolyse führte zur vollständigen Spaltung der Prohormone, und durch längere Inkubation mit Essigsäure konnte keine weitere Zunahme des cGMP-Spiegels erreicht werden (Abb. 5.9, 30-60 min). Die Aktivität der durch die vollständige Hydrolyse von Proguanylin mit Essigsäure freigesetzten Reste 80-94 war bei der gleichen eingesetzten Ausgangskonzentration ähnlich zu der Aktivität von synthetischem Guanylin mit selektiv eingeführten Disulfidbrücken (Abb. 5.9, 30-60 min und schwarze Balken). Da die korrekte Disulfidverbrückung eine Voraussetzung für die biologische Aktivität von Guanylin ist (Klodt *et al.*, 1997, Currie *et al.*, 1992), bestätigte der Nachweis der Aktivität des Hormonanteils von Proguanylin (Reste 80-94) ebenfalls die Ausbildung der nativen Disulfidbrücken für das rekombinante Prohormon (vgl. Kapitel 5.1.4.3).

5.1.4.5 CD-Spektroskopie

Um die Anteile der ausgebildeten Sekundärstruktur von rekombinantem und natürlichem Proguanylin zu vergleichen, sowie einen möglichen Einfluß des pH-Wertes auf die Sekundärstruktur zu untersuchen, wurden Fern-UV-CD-Spektren von beiden Proteinen aufgenommen (Abb. 5.10, (a, b)).

Die Spektren von rekombinantem und natürlichem Proguanylin sind typisch für Proteine mit gemischten Anteilen an α -helikalen, β -Faltblatt- und unstrukturierten Bereichen (Abb. 5.10, (a, b)). Beide Proteine zeigen übereinstimmende Spektren mit einem Nulldurchgang bei etwa 197 nm, einem ausgeprägten Minimum zwischen 205 nm und 230 nm sowie einem Maximum bei etwa 190 nm. Das absolute Minimum ist gegenüber dem α -Helix-typischen Minimum bei 208 nm zu kleineren Wellenlängen verschoben und weist auf unstrukturierte Anteile hin, für die ein Minimum bei etwa 190 nm zu erwarten wäre (Greenfield & Fasman, 1969). Eine Abschätzung der Sekundärstrukturanteile aus den CD-Spektren (Sreerama & Woody, 1993) ergab etwa 33 % α -helikale und 17 % β -Faltblatt-typische Anteile. Vergleichbare Werte wurden aus einer Sekundärstrukturvorhersage (Abb. 5.10, (e)) erhalten und konnten mit den aus der Literatur bekannten Daten (Schulz *et al.*, 1999) korreliert werden.

In früher publizierten Arbeiten findet man zwei deutlich unterschiedliche Fern-UV-CD-Spektren von Proguanylin. Eines dieser Spektren wurde für das natürliche Protein (Schulz *et al.*, 1999), das andere für ein NH₂-terminal um fünf Aminosäuren verlängertes rekombinantes Proguanylin (Garcia *et al.*, 1993) aufgenommen. Die Aufnahme dieser Spektren erfolgte

jedoch mit pH-Werten von 3,3 (natürliches Protein) und 6,0 (rekombinantes Protein) bei deutlich unterschiedlichen und unphysiologischen (natürliches Protein) Bedingungen. Daher wurde die pH-Abhängigkeit der Spektren für den physiologischeren Bereich zwischen pH 4,0 und 7,4 untersucht (Abb. 5.10, (a, b)), um einen direkten Vergleich der CD-Spektren von natürlichem und dem in dieser Arbeit exprimierten Proguanylin zu ermöglichen.

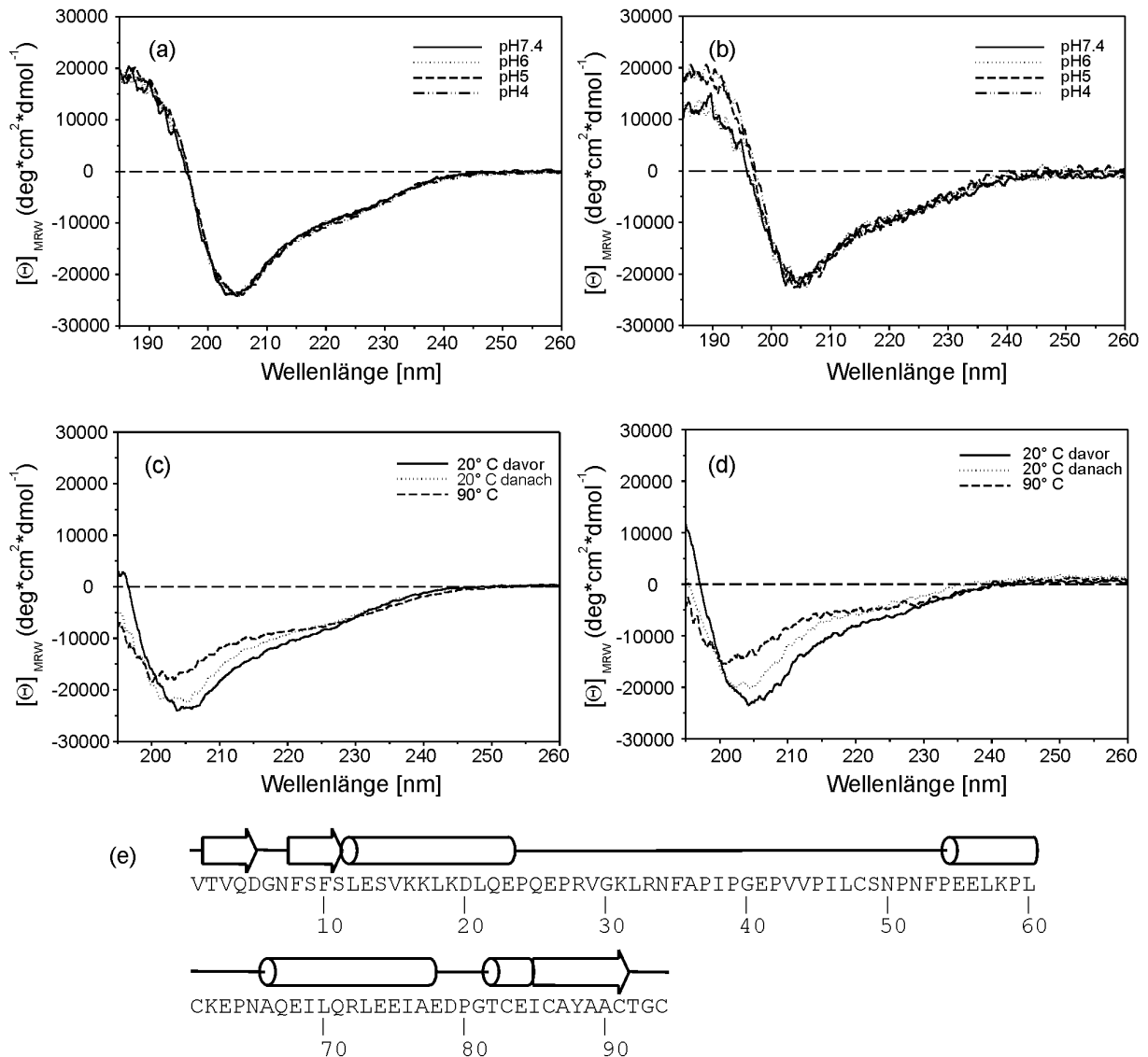


Abbildung 5.10: Fern-UV-CD-Spektren von rekombinantem (a, c) und natürlichem (b, d) Proguanylin. Die Aufnahme der Spektren von Proben unterschiedlicher pH-Werte (a, b) erfolgte bei Raumtemperatur in einer 1 mm Küvette und mit den in Kapitel 4.18.1 aufgeführten Puffern. Die Konzentrationen der Proteinlösungen betrugen dabei 9,5 μ M für rekombinantes und 3,5 μ M für natürliches Proguanylin. Die Aufnahme zusätzlicher Spektren bei verschiedenen Temperaturen (c, d) erfolgte bei Proteinkonzentrationen von jeweils 1 μ M in 10 mM Kalium-Phosphat, pH 6,0 (Schichtdicke der Küvette: 1 cm). (c) und (d): davor: vor dem Aufheizen; danach: nach dem Abkühlen. (e) Sekundärstrukturvorhersage (Jones, 1999) für natürliches Proguanylin.

Für natürliches Proguanylin konnten bei den unterschiedlichen pH-Werten sehr geringe Änderungen in den Spektren beobachtet werden: So war bei pH 7,4 eine leichte Verschiebung des Nulldurchgangs zu kleineren Wellenlängen zu sehen, und bei pH 6 und pH 7,4 kam es zu einer Abnahme der Intensitäten bei etwa 190 nm (Abb. 5.10, (b)). Bei rekombinantem Proguanylin wurden über den gesamten untersuchten pH-Bereich (pH 4,0-7,4) keine signifikanten Veränderungen in den CD-Spektren festgestellt (Abb. 5.10, (a)).

Der Einfluß der Temperatur auf die Stabilität der beiden Proteine bzw. deren Sekundärstruktur wurde durch den Vergleich von vor dem Aufheizen, bzw. nach dem Abkühlen, sowie bei 90 °C aufgenommenen CD-Spektren untersucht (Kapitel 4.18.2; Abb. 5.10, (c, d)). Im Vergleich mit den vor dem Aufheizen aufgenommenen Spektren zeigte das Spektrum bei 90 °C eine Verschiebung des Nulldurchgangs und des absoluten Minimums bei 205 nm zu kleineren Wellenlängen bei gleichzeitiger Abnahme der Signalintensität zwischen 205 nm und 230 nm (Abb. 5.10, (c, d), gestrichelte Linien) und weist daher auf eine deutliche Abnahme der Sekundärstruktur hin (Greenfield & Fasman, 1969). Nach dem Abkühlen war die Form der Spektren ähnlich mit der zum Beginn des Experiments, jedoch wurde ein Verlust in der gesamten Signalintensität und eine Verschiebung des Minimums und Nulldurchgangs verzeichnet (Abb. 5.10, (c, d), gepunktete Linien). Durch die langsame Heiz- und Abkühlrate war die thermische Denaturierung der beiden Proteine nicht vollständig reversibel (vgl. Kapitel 5.2).

Durch den Vergleich der Fern-UV-CD-Spektren von rekombinantem und natürlichem Proguanylin konnte eine übereinstimmende Sekundärstruktur für beide Proteine nachgewiesen werden. Diese wurde durch pH-Werte zwischen 4,0 und 7,4 nicht wesentlich beeinflusst.

5.1.4.6 1D-¹H-NMR Spektroskopie

Um neben der Sekundär- auch die Tertiärstruktur von rekombinantem und natürlichem Proguanylin vergleichen zu können, wurden 1D-¹H-NMR Spektren von beiden Proteinen aufgenommen (Abb. 5.11).

Die Spektren beider Proteine sind nahezu identisch und weisen eine große Dispersion der Resonanzen über einen Bereich von mehr als 10 ppm auf. Die insbesondere durch die Wechselwirkung mit aromatischen Aminosäuren zustandekommende Hochfeldverschiebung einzelner Methylresonanzen bei etwa 0 ppm (Abb. 5.11) sowie die gute Dispersion der

Amidprotonenverschiebungen von etwa 6,5 bis 10 ppm sind typisch für Proteine mit einer ausgeprägten Tertiärstruktur. Die minimalen Unterschiede in den Spektren der beiden Proteine beschränken sich im Wesentlichen auf die Region der Amidprotonen und basieren auf möglichen geringen Differenzen der pH-Werte der Proben. Für natürliches und rekombinantes Proguanylin können daher übereinstimmende Strukturen angenommen werden.

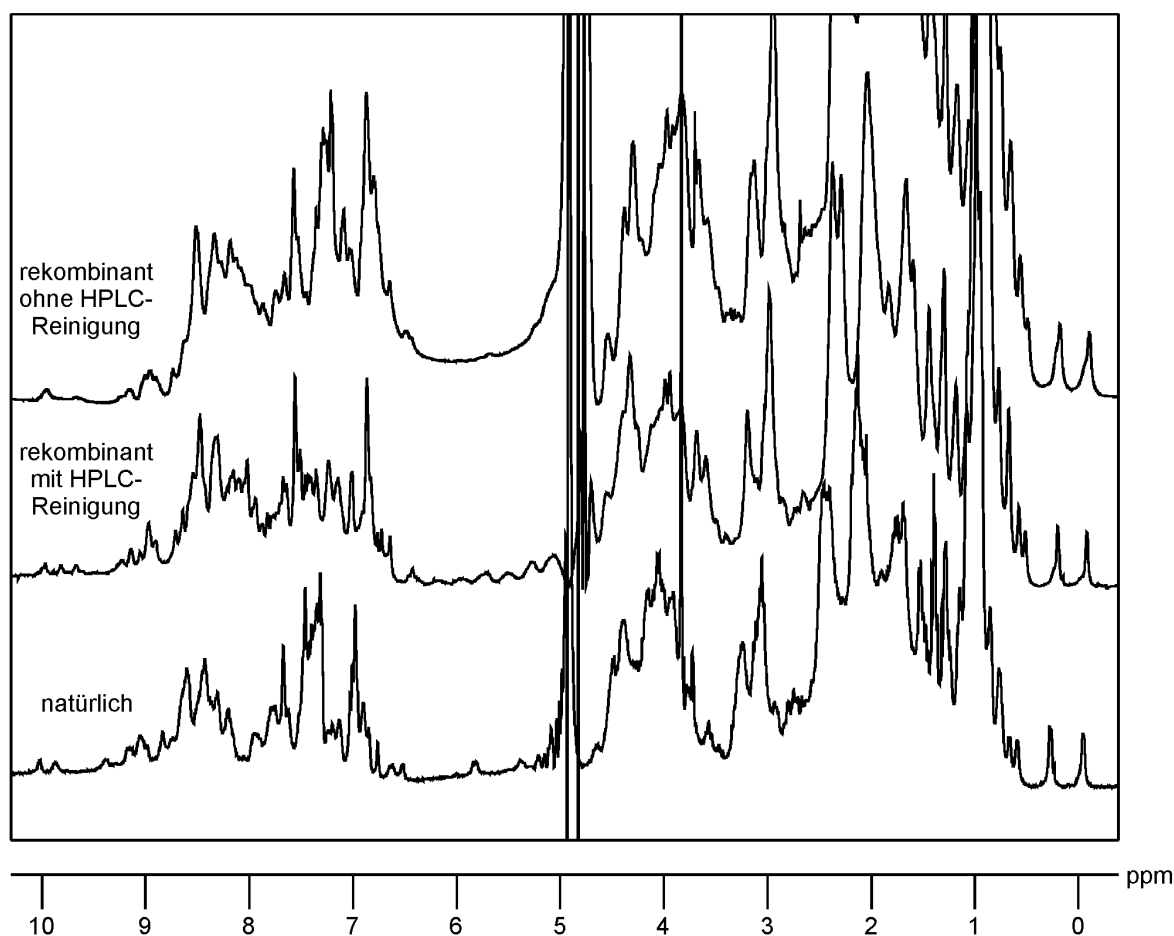


Abbildung 5.11: 1D-¹H-NMR Spektren von rekombinantem und natürlichem Proguanylin bei 20 °C. Meßbedingungen: rekombinantes (1 mM) und natürliches (2 mM) Proguanylin in 50 mM Kalium-Phosphat (10 % D₂O, v/v), pH 6,0; die ppm-Werte sind auf DSS als externen Standard bezogen.

Für die Reinigung von natürlichem Proguanylin aus menschlichem Hämofiltrat wurde unter anderem die RP-HPLC angewandt (Schrader *et al.*, 1997; Schulz *et al.*, 1999). Daher war es naheliegend, diesen zwar denaturierenden, jedoch die Disulfidverbrückung nicht beeinflussenden Reinigungsschritt ebenfalls für die Gewinnung von sehr reinem rekombinantem Proguanylin zu verwenden. Die homonuklearen 1D-NMR Spektren von rekombinantem

Proguanylin, welches mit bzw. ohne abschließende RP-HPLC gereinigt wurde, zeigten bei Anwendung dieses zusätzlichen Schrittes nach übereinstimmender Prozessierung eine allgemein bessere Auflösung der Signale (Abb. 5.11). Diese führte zu einer höheren Homogenität der aufgenommen ^1H , ^{15}N Korrelationsspektren (Kapitel 5.1.5). Die RP-HPLC war demnach als Methode für die Reinigung von rekombinantem Proguanylin geeignet.

5.1.4.7 Analytische Ultrazentrifugation zur Untersuchung des Assoziationsgrades

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war die Datenlage bezüglich des Oligomerzustandes von Proguanylin nicht eindeutig (Schulz *et al.*, 1999, Hidaka *et al.*, 2000), und es wurde sogar ein stabiler dimerer Zustand postuliert (Hidaka *et al.*, 2000). Daher sollten Sedimentationsgleichgewichts- und Sedimentationsgeschwindigkeits-Experimente mit rekombinantem und natürlichem Proguanylin durchgeführt werden, um eine genaue Bestimmung des Assoziationsgrades zu ermöglichen. Die bei diesen Experimenten eingesetzten Proteinkonzentrationen lagen mit 0,3 bis 1 mM im für die NMR Spektroskopie benötigten Konzentrationsbereich.

Experimente mit rekombinantem Proguanylin

Für die Durchführung der Sedimentationsgeschwindigkeits-Experimente wurde RP-HPLC-gereinigtes rekombinantes Proguanylin (Kapitel 4.13.3 und 5.1.4.6) zunächst in einer Konzentration von 310 μM eingesetzt und die erhaltenen Absorptionsdaten an Gleichung 4.13 bzw. 4.14 (Kapitel 4.17.1) angepaßt (Abb. 5.12).

Als Maß für die Qualität der angepaßten Konzentrationsprofile (Abb. 5.12, (a)) wird üblicherweise die Abweichung zwischen experimentellen und angepaßten Werten (RMSD) in Kombination mit einer Auftragung dieser Differenzen (*residuals*) gegen den Abstand vom Rotormittelpunkt verwendet (Abb. 5.12, (b)). Im Fall der an die Sedimentationsdaten von rekombinantem Proguanylin angepaßten Werte ergaben sich nur minimale, über den gesamten radialen Bereich statistisch verteilte Abweichungen. Zusammen mit einem RMSD von 0,0056 deutet dies auf eine hohe Genauigkeit der angepaßten Daten hin. Die Analyse der entsprechenden Sedimentationskoeffizienten- bzw. Molekulargewichtsverteilungen (Gleichung 4.13, 4.14) zeigt jeweils nur eine einzige gelöste Komponente (Abb. 5.13) mit einem Sedimentationskoeffizienten von 1,37 S, einem dem Proguanylin-Monomer

entsprechenden Molekulargewicht von 10020 Da, einem Diffusionskoeffizienten von $1,22 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ und einem Verhältnis der Reibungskoeffizienten f/f_0 von 1,22.

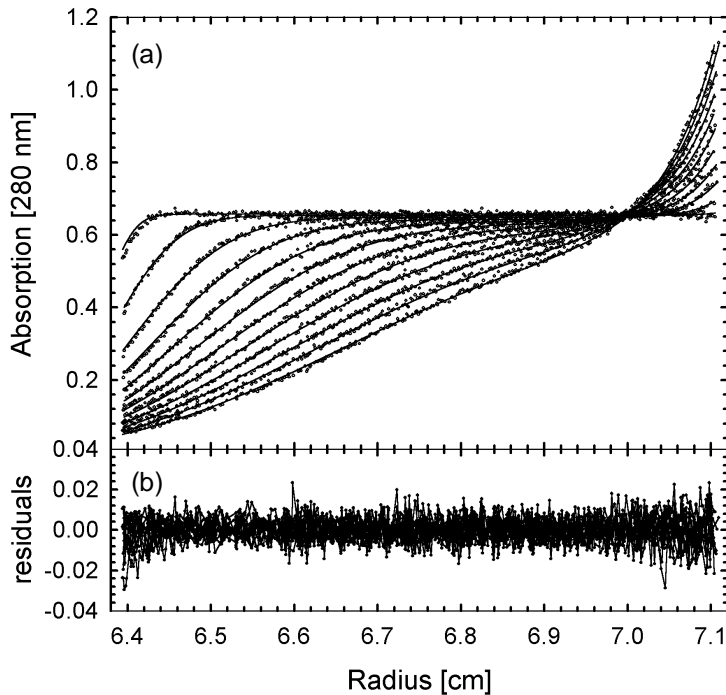


Abbildung 5.12: Sedimentationsgeschwindigkeits-Experiment mit rekombinantem Proguanylin. (a) Die gemessenen Absorptionsdaten wurden gegen den Abstand vom Rotormittelpunkt aufgetragen (Punkte). Für die Anpassung der Daten an Gleichung 4.13 und 4.14 (Linien: angepasste Daten; RMSD = 0,0054) wurde ein Verhältnis der Reibungskoeffizienten von $f/f_0 = 1,22$ bestimmt. (b) Differenzen zwischen experimentellen und angepassten Daten (*residuals*) als Funktion des Abstands vom Rotormittelpunkt. Meßbedingungen: Die Zentrifugation wurde bei 20 °C und 40000 rpm durchgeführt. Die Detektion der Absorptionsdaten erfolgte alle 300 s

ohne Mittelung der einzelnen Meßwerte und über einen Zeitraum von etwa 4 h. Ausgangskonzentration: 310 μM ; Puffer: 50 mM Natrium-Phosphat/50 mM NaCl, pH 7,4.

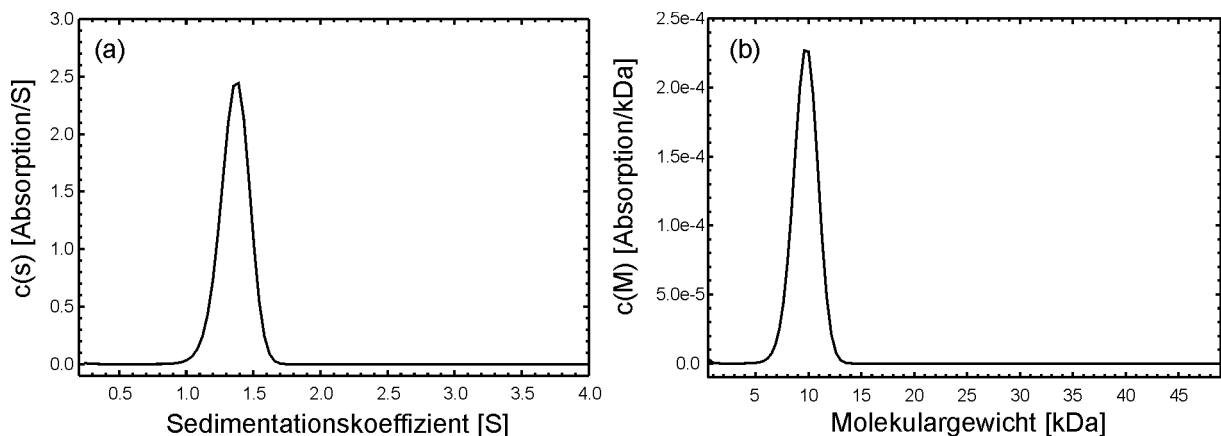


Abbildung 5.13: Analyse der molekularen Größenverteilung von rekombinantem Proguanylin. Die berechneten Sedimentationskoeffizienten- $c(s)$ (a), bzw. Molekulargewichtsverteilungen $c(M)$ (b) sind gegen die Sedimentationskoeffizienten, bzw. Molekulargewichte aufgetragen. Beide Verteilungen wurden mit einem Konfidenzniveau der Regularisierung nach der Maximum-Entropie-Methode von $p = 0,95$, einem Verhältnis f/f_0 von 1,22 und einer Auflösung von $n = 100$ Sedimentationskoeffizienten oder molekularen Massen berechnet (Kapitel 4.17.2). Meßbedingungen: vgl. Abb. 5.12.

Eine unabhängige Bestätigung für das Vorliegen eines Proguanylin-Monomers in Lösung wurde durch die Auswertung des Sedimentationsgleichgewichts-Experiments, das bei der gleichen Ausgangskonzentration von 310 μM durchgeführt wurde, erhalten. Durch Anpassen der experimentellen Absorptionsdaten an Gleichung 4.5 (Abb. 5.14; RMSD = 0,007) ergab sich ein Molekulargewicht der sedimentierenden Moleküle von 9982 Da. Auch dieser Wert entsprach im Rahmen der bei der analytischen Ultrazentrifugation möglichen Genauigkeit dem Molekulargewicht eines Proguanylin Monomers, für das eine tatsächliche Masse von 10491 Da bestimmt wurde (Kapitel 5.1.4.1). Im Unterschied zum Sedimentationsgeschwindigkeits-Experiment wurde bei der Auswertung der Gleichgewichtsdaten eine geringe Menge ($\sim 10\%$) einer weiteren gelösten Komponente mit einem Molekulargewicht von etwa 49 kDa identifiziert.

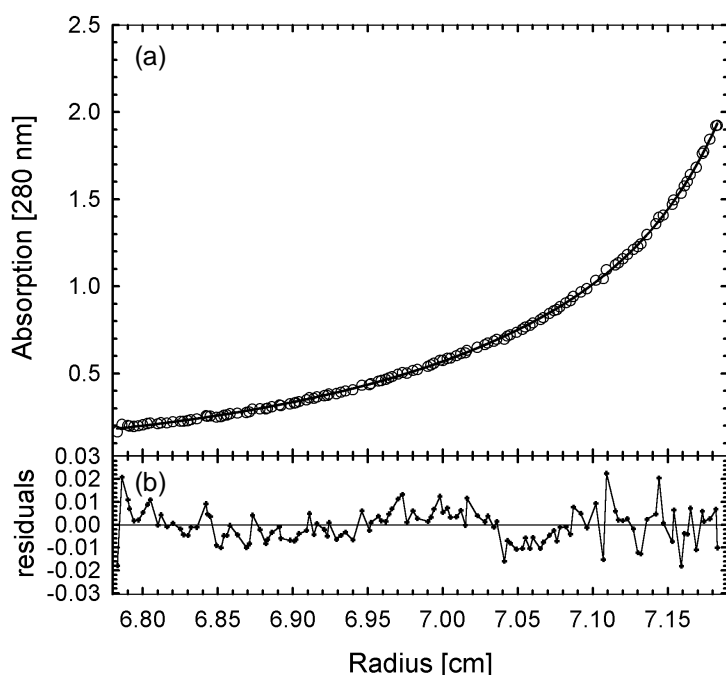


Abbildung 5.14: Sedimentationsgleichgewichts-Experiment mit rekombinantem Proguanylin (310 μM in 50 mM Natrium-Phosphat/50 mM NaCl, pH 7,4). (a) Absorptionsdaten als Funktion des Abstandes vom Rotormittelpunkt (offene Kreise). Die an Gleichung 4.5 angepaßten Daten sind als durchgezogene Linie dargestellt (RMSD = 0,007) (b) Differenzen zwischen experimentellen und angepaßten Daten (*residuals*) als Funktion des Abstandes vom Rotormittelpunkt. Meßbedingungen: Das Sedimentationsgleichgewicht wurde durch Zentrifugation für mindestens 20 h bei 20 °C und 25000 rpm erreicht.

Neben den beschriebenen wurden weitere Sedimentationsgleichgewichts- und Sedimentationsgeschwindigkeits-Experimente mit einer 1,2 mM konzentrierten Proguanylin-Probe durchgeführt. Auch diese Daten ließen sich durch ein Monomer in Lösung beschreiben, die Qualität der erhaltenen Fits war jedoch deutlich schlechter als die der niedrigen Konzentration (Daten nicht gezeigt). Zum Teil konnte dies auf die hohe Proteinkonzentration zurückgeführt werden, da diese die Idealität der untersuchten Lösung und somit das Sedimentationsverhalten der Moleküle beeinflusst (Ralston, 1993). Durch die Berück-

sichtigung von 3-10 % der bereits beobachteten hochmolekularen Verunreinigung (49 kDa; siehe oben) konnte die Qualität der angepaßten Daten dennoch deutlich verbessert werden. Aus den Sedimentationsgleichgewichts-Daten ergab sich mit dieser Annahme ein Molekulargewicht von 13205 Da, das etwas größer als das für das Proguanylin-Monomer erwartete war. Aus den bislang vorgestellten Sedimentationsexperimenten konnte daher eindeutig belegt werden, daß rekombinantes Proguanylin bei den hohen, für die NMR Spektroskopie benötigten Konzentrationen mindestens zu 90 % als Monomer vorliegt.

Experimente mit natürlichem Proguanylin

Bei den mit natürlichem Proguanylin durchgeführten Sedimentationsgeschwindigkeits- und Sedimentationsgleichgewichts-Experimenten wurden 1 mM und 310 μ M konzentrierte Proben verwendet. Die Aufnahme der experimentellen Daten erfolgte in diesem Fall durch die Messung der Brechungsindexverschiebungen (*fringe displacement*; Abb. 5.15). Die Verwendung von Doppelsektorzellen mit Titankern ermöglichte eine höhere Rotorgeschwindigkeit (60000 rpm) und eine damit verbundene bessere Auflösung der Daten.

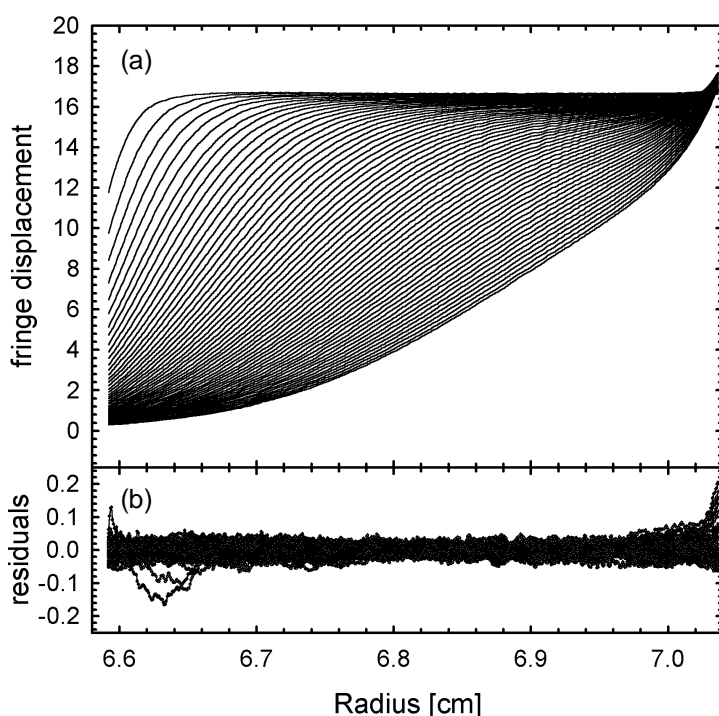


Abbildung 5.15: Sedimentationsgeschwindigkeits-Experiment mit natürlichem Proguanylin. (a) Die gemessenen Brechungsindexverschiebungen (*fringe displacement*) wurden gegen den Abstand vom Rotormittelpunkt aufgetragen. Aus Gründen der Übersichtlichkeit ist nur jede fünfte der 300 für die Analyse verwendeten Aufnahmen dargestellt. Für die Anpassung der Daten an Gleichung 4.13 und 4.14 (RMSD = 0,02) wurde ein Verhältnis der Reibungskoeffizienten von $f/f_0 = 1,35$ bestimmt. (b) Differenzen zwischen experimentellen und angepaßten Daten (*residuals*) als Funktion des Abstands vom Rotormittelpunkt. Meßbedingungen: Die Zentrifugation wurde bei 20 °C und 60000 rpm durchgeführt. Die Detektion der Brechungsindexverschiebungen erfolgte alle 30 s über einen Zeitraum von etwa 4 h. Ausgangskonzentration: 1 mM; Puffer: 50 mM Natrium-Phosphat/ 50 mM NaCl, pH 7,4.

Die Zentrifugation wurde bei 20 °C und 60000 rpm durchgeführt. Die Detektion der Brechungsindexverschiebungen erfolgte alle 30 s über einen Zeitraum von etwa 4 h. Ausgangskonzentration: 1 mM; Puffer: 50 mM Natrium-Phosphat/ 50 mM NaCl, pH 7,4.

Für natürliches Proguanylin konnten die Daten des Sedimentationsgeschwindigkeits-Experiments auch für die hohe Proteinkonzentration mit hoher Genauigkeit an das Modell der molekularen Größenverteilung (Gleichungen 4.13 und 4.14) angepaßt werden (Abb. 5.15; $\text{RMSD} = 0,02$). In den entsprechenden Sedimentationskoeffizienten- bzw. Molekulargewichtsverteilungen (Gleichung 4.13, 4.14) kann jeweils eine einzelne Hauptkomponente identifiziert werden, die 92 % der Probe umfaßt (Abb. 5.16). Eine Abschätzung für diese Hauptspezies ergab einen Sedimentationskoeffizienten von 1,29 S und ein dem Proguanylin-Monomer entsprechendes Molekulargewicht von 10318 Da (tatsächliche M: 10337 Da). Mit einem Diffusionskoeffizient von $1,14 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ und einem Verhältnis der Reibungskoeffizienten f/f_0 von 1,35 weichen die für natürliches Proguanylin bestimmten Werte um weniger als 10 % von denen des rekombinanten Proteins ab und sind daher mit diesen vergleichbar.

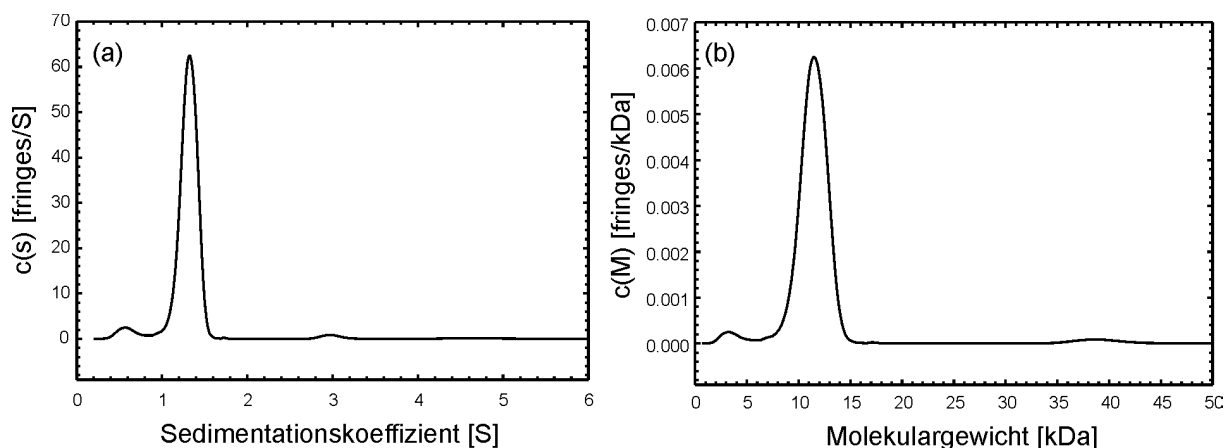


Abbildung 5.16: Analyse der molekularen Größenverteilung von natürlichem Proguanylin. Die berechneten Sedimentationskoeffizienten- $c(s)$ (a), bzw. Molekulargewichtsverteilungen $c(M)$ (b) sind gegen die Sedimentationskoeffizienten, bzw. Molekulargewichte aufgetragen. Beide Verteilungen wurden mit einem Konfidenzniveau der Regularisierung nach der Maximum-Entropie-Methode von $p = 0,95$, einem Verhältnis f/f_0 von 1,35 und einer Auflösung von $n = 100$ Sedimentationskoeffizienten oder molekularen Massen berechnet (Kapitel 4.17.2). Meßbedingungen: vgl. Abb. 5.15.

Das mit einer Proteinkonzentration von $310 \mu\text{M}$ durchgeführte Sedimentationsgeschwindigkeits-Experiment bestätigte die oben beschriebenen Ergebnisse über das Vorliegen eines Proguanylin-Monomers in Lösung. Bei dieser niedrigen Konzentration ergab sich ein Sedimentationskoeffizient von 1,28 S und ein Molekulargewicht von 10800 Da (Daten nicht gezeigt).

Die bei den gleichen Proteinkonzentrationen (1 mM und $310 \mu\text{M}$) durchgeführten

Sedimentationsgleichgewichts-Experimente bestätigen die bisherigen Ergebnisse bezüglich des Oligomerzustandes des natürlichen Proteins. Durch Anpassen der experimentellen Brechungsindexverschiebungen an Gleichung 4.5 ergaben sich Molekulargewichte der sedimentierenden Moleküle von 10957 Da für die hochkonzentrierte Probe (Abb. 5.17; RMSD = 0,014) und 10779 Da für die Probe mit niedriger Konzentration (Daten nicht abgebildet). Bei der Analyse der Größenverteilung konnte neben der Hauptkomponente (natürliches Proguanylin) eine geringe Menge einer niedermolekularen Verunreinigung identifiziert werden (Abb. 5.16), die einem Anteil von weniger als 10 % der Proben entsprach. Das Molekulargewicht (M : 3,47 kDa) und der Sedimentationskoeffizient ($s = 0,59$ S) dieser Verunreinigung wurde aus den entsprechenden Verteilungsfunktionen (Abb. 5.16) bestimmt und für die Auswertung der Sedimentationsgleichgewichts-Experimente verwendet. Dadurch wurde eine hohe Genauigkeit der angepaßten Daten erreicht (RMSD = 0,014), welche sich in der zufälligen Verteilung der Differenzen zwischen experimentellen und berechneten Werten widerspiegelt (Abb. 5.17, (b)).

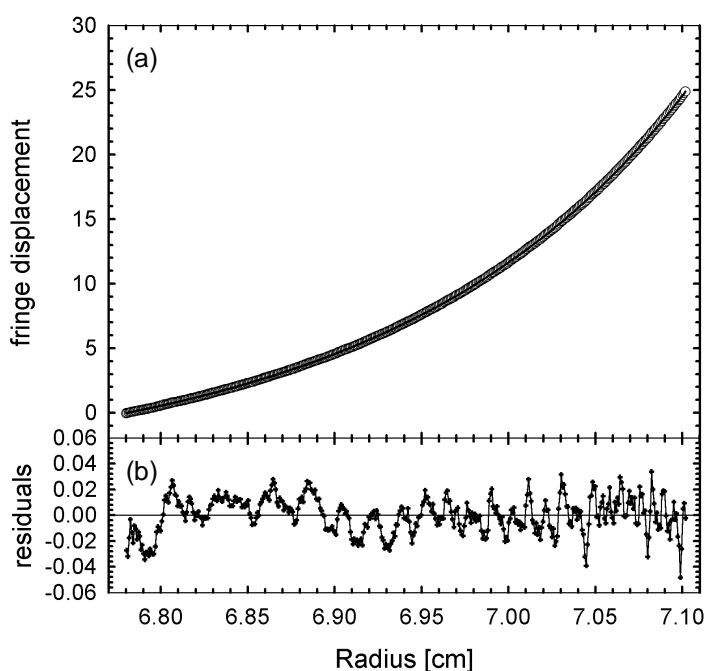


Abbildung 5.17: Sedimentationsgleichgewichts-Experiment mit natürlichem Proguanylin (1 mM in 50 mM Natriumphosphat/50 mM NaCl, pH 7,4). (a) Brechungsindexverschiebungen (*fringe displacement*) als Funktion des Abstandes vom Rotormittelpunkt (offene Kreise). Die an Gleichung 4.5 angepaßten Daten sind als durchgezogene Linie dargestellt (RMSD = 0,014) (b) Differenzen zwischen experimentellen und angepaßten Daten (*residuals*) als Funktion des Abstandes vom Rotormittelpunkt. Meßbedingungen: Das Sedimentationsgleichgewicht wurde durch Zentrifugation für mindestens 20 h bei 20 °C und 25000 rpm erreicht.

Alle durchgeführten Sedimentationsexperimente konnten eindeutig nachweisen, daß rekombinantes und natürliches Proguanylin als Monomer in Lösung vorliegen. Dieser Assoziationsgrad bleibt für beide Proteine auch bei millimolaren Konzentrationen unverändert.

5.1.5 Strukturbestimmung von Proguanylin in Lösung

Frühere NMR-spektroskopische Untersuchungen haben gezeigt, daß auf der Basis der homonuklearen Spektren von natürlichem Proguanylin (Schulz *et al.*, 1999) keine vollständige Zuordnung der Resonanzen und somit auch keine Strukturbestimmung möglich ist. In dieser Arbeit sollten daher mehrdimensionale NMR Spektren von ^{15}N und $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ markiertem rekombinantem Proguanylin (Kapitel 5.1.3.5) für die sequentielle Zuordnung und Strukturbestimmung in Lösung verwendet werden. Das für diese Experimente verwendete rekombinante Protein wurde in einem letzten Schritt mittels RP-HPLC gereinigt, um die Homogenität der ^1H , ^{15}N -HSQC Spektren zu verbessern (vgl. 1D- ^1H -NMR Spektren, Kapitel 5.1.4.6 und 5.1.3.5). In Anlehnung an frühere Aufnahmebedingungen wurden fast alle Experimente dieser Arbeit bei 293 K durchgeführt.

Für die NH_2 -terminale Gly-Pro-Sequenz des rekombinanten Proteins wurden keine Hinweise auf sekundäre oder tertiäre Wechselwirkungen mit den übrigen Bereichen des Proteins in Form von NOE-Kreuzresonanzen in den Spektren beobachtet. Da für die spätere Strukturbestimmung zusätzlich die 2D-Spektren von natürlichem Proguanylin verwendet wurden, wurde bei der Zuordnung und anschließenden Berechnung der dreidimensionalen Struktur die Sequenz des natürlichen Proteins zugrunde gelegt.

5.1.5.1 Sequenzspezifische Zuordnung der Resonanzen

In Abbildung 5.18 ist das ^1H , ^{15}N -HSQC Spektrum von Proguanylin mit der getroffenen Zuordnung der Resonanzen gezeigt. Die gute Dispersion der Amidresonanzen über einen Bereich von etwa 3,5 ppm ist für ein globulär gefaltetes Protein typisch.

Die sequentielle Zuordnung der Resonanzen erfolgte anhand der typischen intraresidualen und sequentiellen chemischen Verschiebungen der $^{13}\text{C}\alpha$ und $^{13}\text{C}\beta$ Spins, die durch Analyse der Tripelresonanzexperimente HNCA und CBCA(CO)NH erhalten wurden. Im ^1H , ^{15}N -HSQC Spektrum von Proguanylin (Abb. 5.18) können trotz der allgemein guten Dispersion Bereiche mit Überlagerungen von Resonanzen bzw. der Anhäufung von Signalen beobachtet werden. Um die für diese Bereiche auftretenden Mehrdeutigkeiten bei der Zuordnung aufzulösen, wurde die zusätzliche Information aus den HBHA(CO)NH, H(CCO)NH und C(CO)NH Spektren, sowie charakteristische NOE-Kreuzsignale (Wüthrich, 1986; Abb. 5.19) aus den ^{15}N -NOESY-HSQC und ^{15}N -HMQC-NOESY-HSQC Spektren benötigt. Nach der Zuordnung der Amidresonanzen wurden die Verschiebungen der Seitenkettenprotonen den

HBHA(CO)NH, H(CCO)NH und ^{15}N -TOCSY-HSQC Spektren, die Verschiebungen der ^{13}C Spins der Seitenketten den C(CO)NH und CBCA(CO)NH Spektren und die Verschiebungen der ^{13}CO Resonanzen dem HNCO Spektrum entnommen. Aus dem HNHA und ^{15}N -TOCSY-HSQC Spektrum wurden die $^1\text{H}\alpha$ Verschiebungen abgelesen. Aufgrund der nachgewiesenen übereinstimmenden biophysikalischen Eigenschaften der natürlichen und rekombinanten Proteine (Kapitel 5.1.4) konnten für die Zuordnung der Seitenketten der aromatischen Aminosäuren (Phe8, 10, 35, 53 und Tyr88) die 2D-NOESY Spektren von in D_2O gelöstem natürlichem Proguanylin verwendet werden.

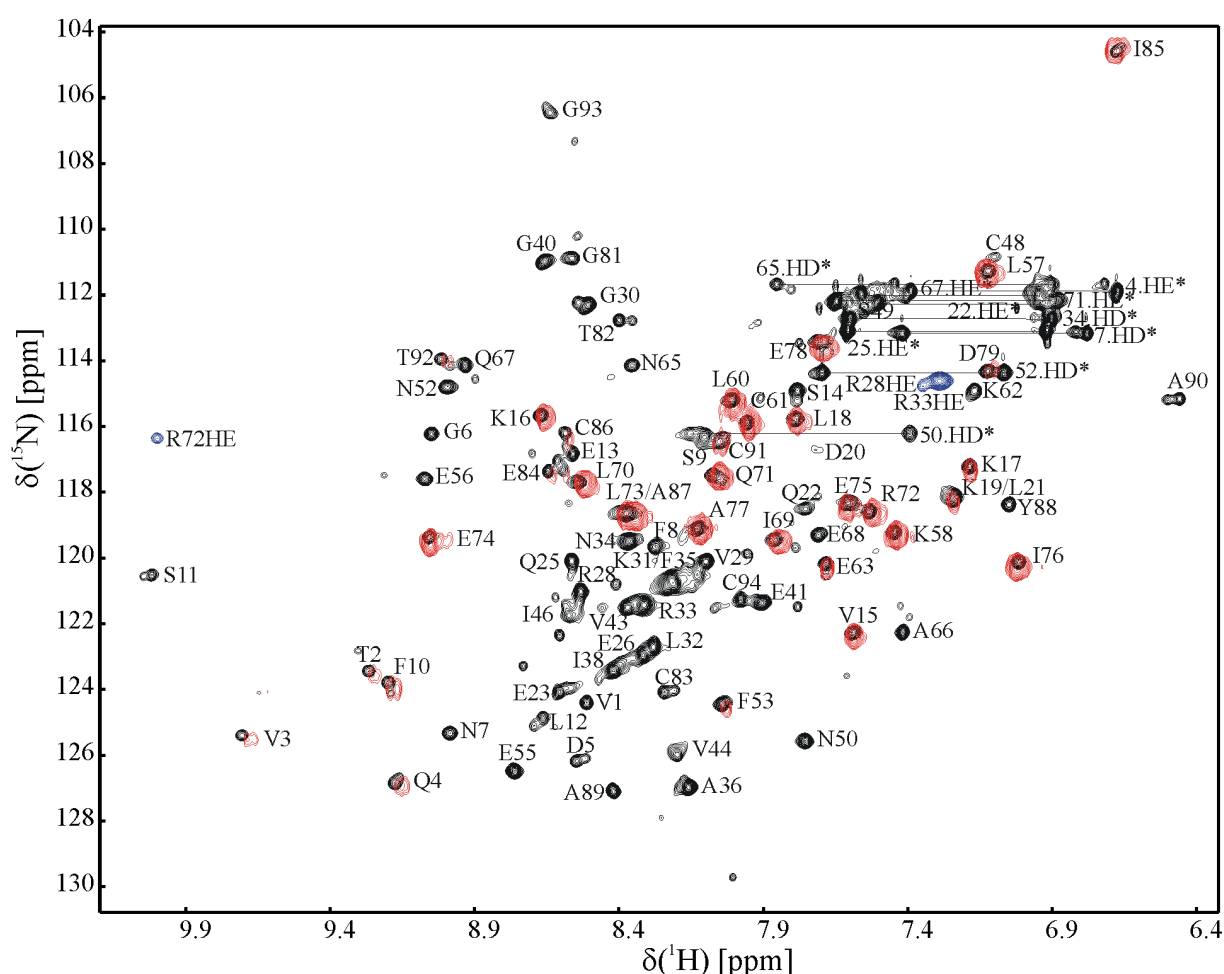


Abbildung 5.18: ^1H , ^{15}N -HSQC Spektrum von ^{15}N Proguanylin. Die Zuordnung der Resonanzen ist angegeben. Gefaltete ϵ -Resonanzen der Argininseitenketten sind in blau dargestellt, die Resonanzen der NH_2 -Seitenketten von Asparagin und Glutamin sind mit einer Linie verbunden. Das 120 min nach dem Lösen von ^{15}N Proguanylin in D_2O erhaltene Spektrum ist in rot wiedergegeben. Meßbedingungen: ^{15}N Proguanylin (1,1 mM) in 50 mM Kalium-Phosphat (10 % D_2O , v/v), pH 6,0 und ^{15}N Proguanylin (500 μM) in Phosphat-gepuffertem D_2O (99,994 %), pH 6,0; die ppm-Werte sind auf DSS als externen Standard bezogen bzw. indirekt über das Frequenzverhältnis ($\omega_{\text{N}}/\omega_{\text{H}} = 0.101329118$; Markley *et al.*, 1998) geeicht.

Da der für die Expression von rekombinantem Proguanylin verwendete Bakterienstamm *E. coli* AD494(DE3) nicht zur Biosynthese von Leucin befähigt ist, wurde bei der Anzucht der Zellen auf isotonenmarkiertem M9 Minimalmedium ^{15}N markiertes Leucin zugesetzt (Kapitel 3.4 und 5.1.3.5). Die Leucinreste (Leu12, 18, 21, 32, 57, 60, 70 und 73) der $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ markierten Probe waren daher nur ^{15}N markiert, so daß deren Zuordnung vor allem mit Hilfe der ^{15}N editierten Spektren erfolgte. Die homonuklearen 2D-Spektren von natürlichem Proguanylin und ein $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ gefiltertes 2D-NOESY Spektrum der doppelt markierten Probe (Kapitel 4.19.3) lieferten zusätzliche hilfreiche Information.

Die Zuordnung ist bis auf das Spinsystem von Leu47 und wenige ^{13}C Resonanzen vollständig und im Anhang (Kapitel 10.3) wiedergegeben. Außerdem wurde die Zuordnung in der BioMagnResBank (<http://www.bmrb.wisc.edu>) unter der Zugriffsnummer 5603 hinterlegt.

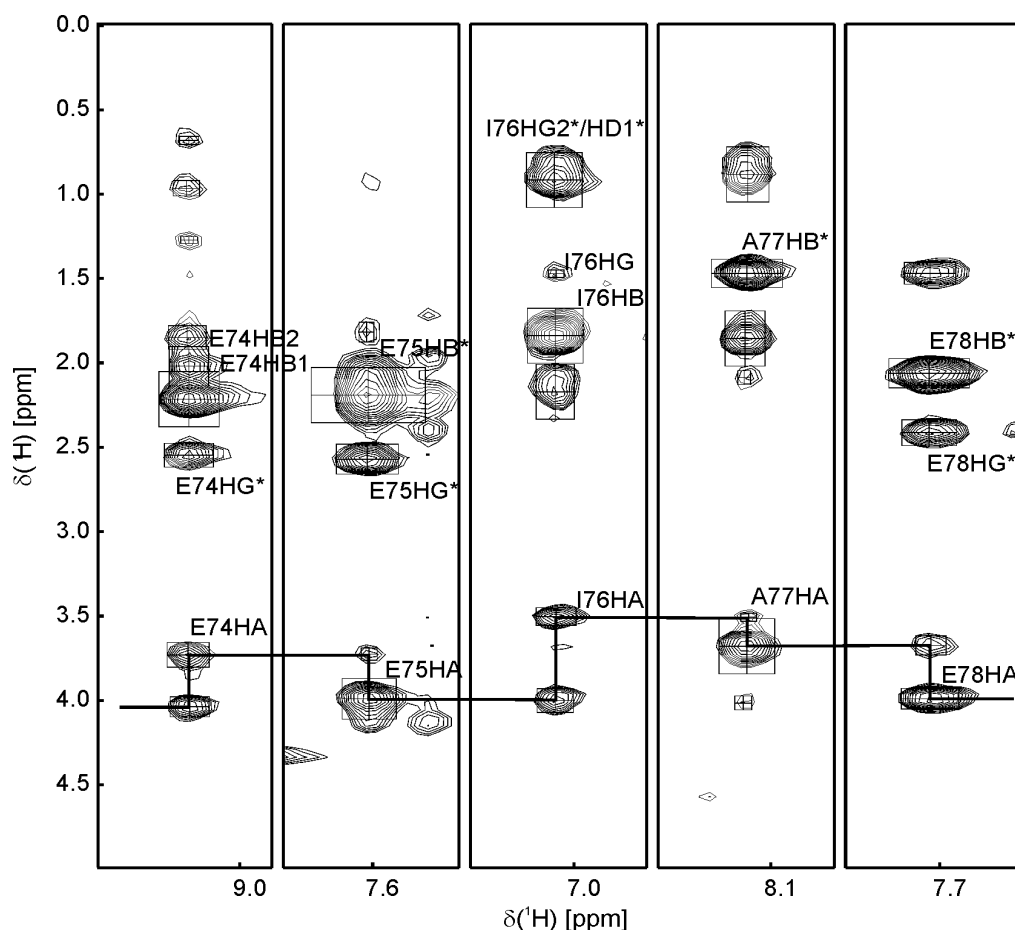


Abbildung 5.19: Beispiel für die Illustration des sogenannten *chaintracing*. Aus dem ^{15}N editierten 3D-NOESY Spektrum extrahierte Ausschnitte wurden für die sequentielle Zuordnung der Spinsysteme nebeneinander gelegt. Charakteristische sequentielle $\text{H}\alpha(i)$ $\text{HN}(i+1)$ NOE-Kreuzresonanzen (*chaintracing*) dienten als ergänzende Information bei der sequenzspezifischen Zuordnung der Resonanzen. Das *chaintracing* ist für den Bereich der $^1\text{H}\alpha$ und ^1HN Resonanzen von Glu74 bis Glu78 gezeigt.

5.1.5.2 Die Prolinkonformation

Prolin ist die einzige Aminosäure, die in zwei relativ starren Konformationen vorliegen kann, wobei das *trans*- sehr viel häufiger als das *cis*-Isomere vorkommt. Da in der Sequenz von Proguanylin 11 Prolinreste enthalten sind, war es für die spätere Berechnung der dreidimensionalen Struktur von Bedeutung, die genaue Konformation aller Proline zu kennen. Diese kann anhand von typischen NOE-Kreuzresonanzen (Wüthrich, 1986), bzw. charakteristischen Differenzen der $^{13}\text{C}\beta$ und $^{13}\text{C}\gamma$ Verschiebungen (Hill *et al.*, 1996; Toy-Palmer *et al.*, 1995) eindeutig bestimmt werden.

Das Auftreten charakteristischer $\text{H}\alpha(i)$ Pro- $\text{H}\delta(i+1)$ NOE-Kreuzresonanzen bei gleichzeitigem Fehlen von $\text{H}\alpha(i)$ Pro- $\text{H}\alpha(i+1)$ und $\text{HN}(i)$ Pro- $\text{H}\alpha(i+1)$ NOEs in den ^{13}C -NOESY-HSQC, ^{15}N -NOESY-HSQC und 2D-NOESY Spektren lieferte Hinweise auf das Vorliegen einer *trans*-Konformation für alle 11 Reste. Für Prolin-Seitenketten mit zugeordneten $^{13}\text{C}\beta$ und $^{13}\text{C}\gamma$ Resonanzen wurde dieser Befund durch die typischen geringen Differenzen von nur etwa 5 ppm zwischen den genannten Resonanzen bestätigt. Lediglich für den mittleren Sequenzabschnitt wurde aufgrund der erhöhten Flexibilität dieser Region (Kapitel 5.1.5.5) zusätzlich ein geringer Anteil mit *cis*-Konformation gefunden (s.u., Kapitel 5.1.5.3).

5.1.5.3 Hinweise auf die Topologie von Guanylin

Das Peptidhormon Guanylin (entsprechend den Resten 80-94 von Proguanylin) liegt in Lösung als Gemisch aus zwei sich ineinander umwandelnden, sogenannten topologischen Isomeren vor. Diese beiden als A- und B-Form bezeichneten Isomere (Kapitel 1.3.2) können anhand ihrer charakteristischen, deutlich unterschiedlichen chemischen Verschiebungen identifiziert werden (Skelton *et al.*, 1994; Schulz *et al.*, 1998).

Bei der Zuordnung von Proguanylin (Kapitel 5.1.5.1) wurde entsprechend einer einzigen Hormonkonformation nur ein Satz an Spinsystemen für die betroffene Region (Reste 80-94) gefunden. Da das ^1H , ^{15}N -HSQC Spektrum von Proguanylin (Abb. 5.18) einige schwächere zusätzliche Resonanzen aufweist, wurden diese auf das Vorliegen einer möglichen zweiten Hormonkonformation untersucht.

Der mittlere Sequenzabschnitt von Proguanylin enthält kurze, zum Teil repetetive Sequenzen mit einem hohen Anteil an Prolinresten. Für die diesen Prolinen benachbarten Aminosäuren konnten jeweils zwei Resonanzen unterschiedlicher Intensität im ^1H , ^{15}N -HSQC Spektrum identifiziert werden, so daß die nicht-zugeordneten Resonanzen größtenteils auf einen

geringen Anteil der *cis-trans*-Prolin-Isomerisierung in diesem Bereich zurückzuführen waren. Geringe konformationelle Differenzen in der Geometrie der Disulfidbrücken führten teilweise ebenfalls zum Auftreten von duplizierten, jedoch deutliche schwächeren Resonanzen der jeweils benachbarten Aminosäuren (z.B. bei Thr82 und Ala90). Eine zweite Konformation der Hormonregion konnte somit für das Prohormon ausgeschlossen werden.

Um einen Hinweis auf die Topologie der Hormonregion von Proguanylin zu erhalten, wurden die sekundären chemischen Verschiebungen der $^1\text{H}\alpha$ Resonanzen von Thr82 bis Cys94 mit den für die beiden Guanylin-Isomere publizierten Verschiebungen (Skelton *et al.*, 1994) verglichen (Abb. 5.20).

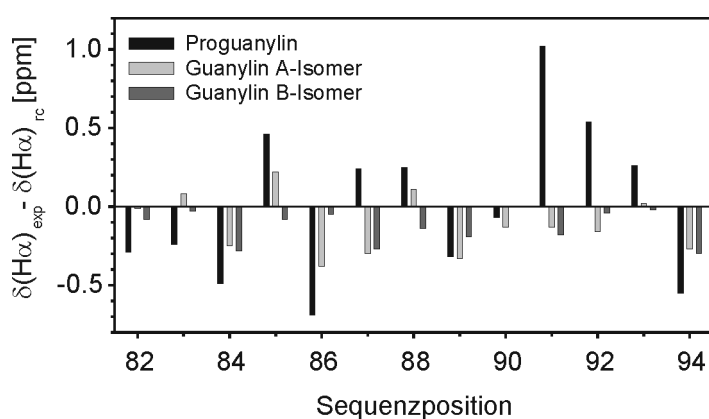


Abbildung 5.20: Vergleich der sekundären $^1\text{H}\alpha$ Verschiebungen der Hormonregion von Proguanylin (Thr82 bis Cys94) mit den Verschiebungen der Guanylin-Isomere (Skelton *et al.*, 1994). Aufgetragen sind die Differenzen zwischen experimentellen $^1\text{H}\alpha$ Verschiebung ($\delta(\text{H}\alpha)_{\text{exp}}$) und den entsprechenden Werten aus unstrukturierten Peptiden ($\delta(\text{H}\alpha)_{\text{rc}}$) (Wishart *et al.*, 1995).

Die beiden Guanylin-Isomere können anhand der deutlich unterschiedlichen sekundären chemischen Verschiebungen von Ile85, Cys86 und Tyr88 identifiziert werden (Abb. 5.20). Bei Proguanylin sind die chemischen Verschiebungen der entsprechenden Reste dem A-Isomer ähnlicher als dem B-Isomer (Abb. 5.20). Auffällige Unterschiede zwischen den sekundären chemischen Verschiebungen von Proguanylin und beiden Guanylin-Isomeren lassen sich auf eine im Prohormon ausgeprägtere Sekundärstruktur und tertiäre Kontakte mit der Prosequenz zurückführen (Kapitel 5.1.5.7).

5.1.5.4 Information über die sequenzspezifische Sekundärstruktur

Sequenzspezifische Hinweise auf das Vorliegen von Elementen mit regulärer Sekundärstruktur wurden durch die Analyse der $^1\text{H}\alpha$, $^{13}\text{C}\alpha$ und ^{13}CO Verschiebungen und Berechnung von Verschiebungsindices (Kapitel 4.19.8) erhalten (Abb. 5.21).

Basierend auf den in Kapitel 4.19.8 beschriebenen Kriterien für die Identifizierung von

Elementen regulärer Sekundärstruktur werden aus der Auftragung des Konsensus-Indexes Hinweise auf vier α -helikale Bereiche erhalten (Abb. 5.21). Diese erstrecken sich von Glu13 bis Asp20, von Phe53 bis Cys61, von Ala66 bis Glu78 und von Gly81 bis Glu84. Obwohl der Konsensus-Index die Kriterien für eine β -Faltblattstruktur streng genommen nicht erfüllt, kann für die Bereiche von Thr2 bis Val3, Ser9 bis Phe10 und Cys91 bis Thr92 dennoch die Tendenz zu einer gestreckten Rückgratkonformation abgeleitet werden. Der zentrale Sequenzabschnitt von Gln22 bis Ile46 weist die für unstrukturierte Bereiche typischen Verschiebungsindices von null auf und ist daher vermutlich nicht an der Ausbildung von regulären Sekundärstrukturelementen beteiligt.

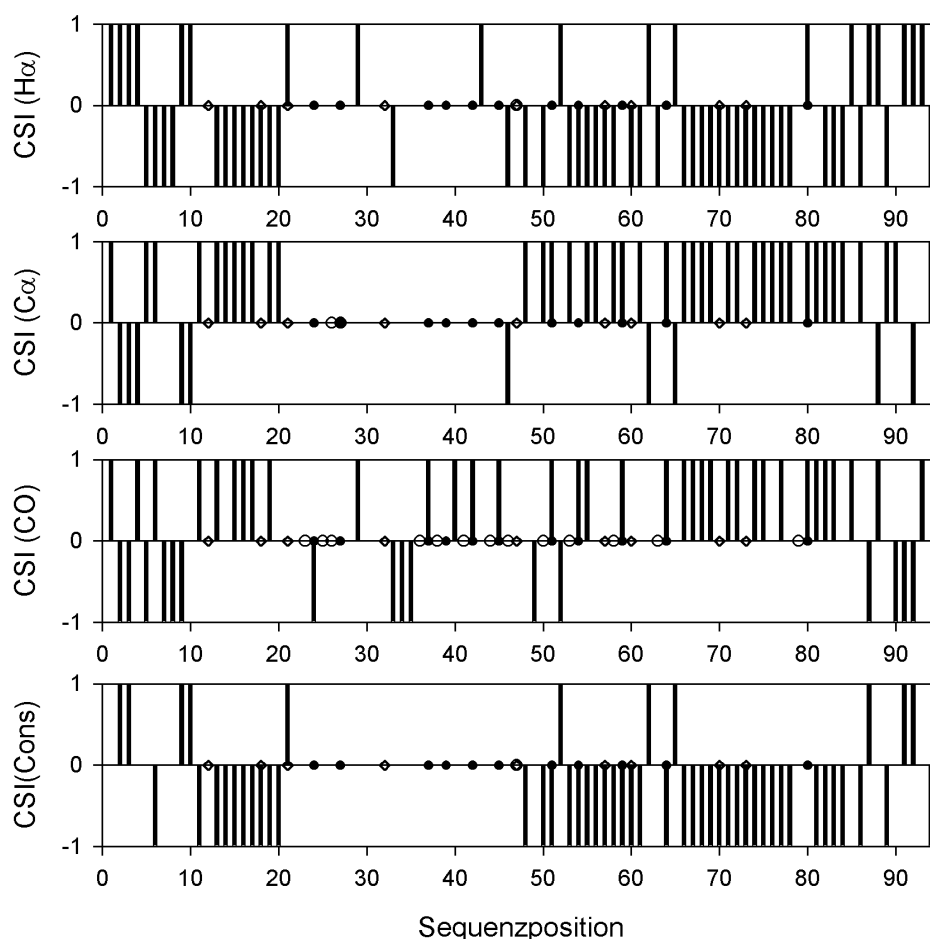


Abbildung 5.21: Chemische Verschiebungsindices (CSI) für Proguanylin. Gezeigt sind die Indices für $^1\text{H}\alpha$, $^{13}\text{C}\alpha$ und ^{13}CO . Der berechnete Konsensus-Index (CSI(Cons)) ist ebenfalls angegeben. Die ausschließlich ^{15}N markierten Leucinreste sind durch weiße Rauten, Proline durch schwarze Kreise und nicht zugeordnete Resonanzen durch weiße Kreise markiert. Die Zuordnung von Leu47 fehlt vollständig.

Die aus der Analyse der sekundären chemischen Verschiebungen erhaltenen Hinweise auf die sequenzspezifische Sekundärstruktur wurden anhand der $^3J(\text{HN}, \text{H}\alpha)$ Kopplungskonstanten (Kapitel 4.20.2) bestätigt (Abb. 5.22). In den als α -helikal angenommenen Bereichen wurden fast ausschließlich Kopplungskonstanten kleiner 6 Hz gemessen. Außerdem wurde der Faltblatt-typische Trend für die Bereiche von Thr2 bis Gln4, Asn7 bis Phe10 und Cys91 bis Thr92 durch Kopplungskonstanten größer als 8 Hz bestätigt (Abb. 5.22). Die Größen der übrigen Kopplungskonstanten zeigten üblicherweise eine übereinstimmende Tendenz mit der entsprechenden sekundären chemischen Verschiebung. Aus der Analyse der HNHA und 2D-COSY Spektren (Kapitel 4.20.2) wurden insgesamt 39 $^3J(\text{HN}, \text{H}\alpha)$ Kopplungskonstanten bestimmt (Abb. 5.22). 30 dieser Kopplungskonstanten hatten Werte kleiner 6 Hz bzw. größer 8 Hz und konnten daher für die nachfolgende Strukturberechnung verwendet werden (Kapitel 5.1.5.6).

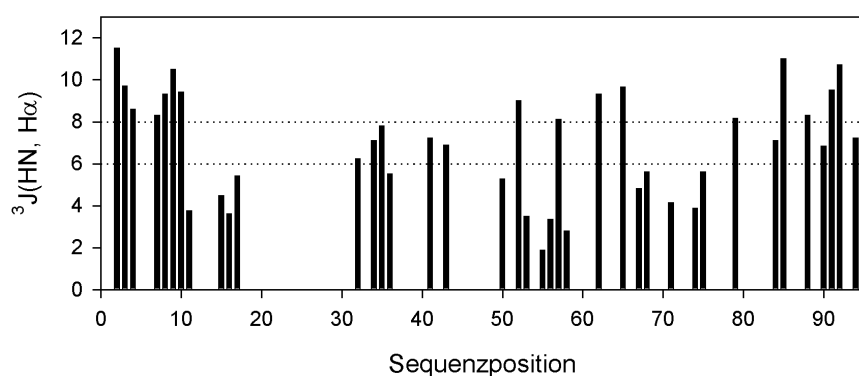


Abbildung 5.22: Die aus den HNHA und 2D-COSY Spektren bestimmten $^3J(\text{HN}, \text{H}\alpha)$ Kopplungskonstanten von Proguanylin sind gegen die Sequenz aufgetragen. Werte von 6 Hz und 8 Hz sind durch gestrichelte Linien markiert.

Die Einbeziehung von Amidprotonen in Wasserstoffbrückenbindungen führt zu einem verlangsamten Austausch dieser Protonen mit denen des Lösungsmittels. Da Elemente mit regulärer Sekundärstruktur durch Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert werden, ist ein langsamer Amidprotonenaustausch ein Hinweis auf das Vorliegen von Sekundärstrukturelementen. Um langsam austauschende Amidprotonen zu identifizieren, wurde ^{15}N markiertes Proguanylin in D_2O gelöst und eine Serie von ^1H , ^{15}N -HSQC Spektren aufgenommen (Kapitel 4.19.3). Amidresonanzen, die 120 min nach dem Lösen des Proteins in D_2O noch ein detektierbares Signal zeigten (Abb. 5.18, rote Resonanzen), wurden als potentielle Wasserstoffbrückendonoren angenommen. Auf diese Weise wurden die Amidprotonen der folgenden 31 Aminosäuren identifiziert: Thr2, Val3, Gln4, Phe10, Val15, Lys16, Lys17, Leu18, Lys19, Phe53, Leu57, Lys58, Leu60, Cys61, Glu63, Ile69, Leu70, Gln71, Arg72,

Leu73, Glu74, Glu75, Ile76, Ala77, Glu78, Asp79, Glu84, Ile85, Cys86, Cys91 und Thr92. Diese langsam austauschenden Amidprotonen können den durch die Verschiebungsindices und Kopplungskonstanten abgeleiteten helikalen und Faltblatt-typischen Bereichen zugeordnet werden (Abb. 5.18 und 5.23).

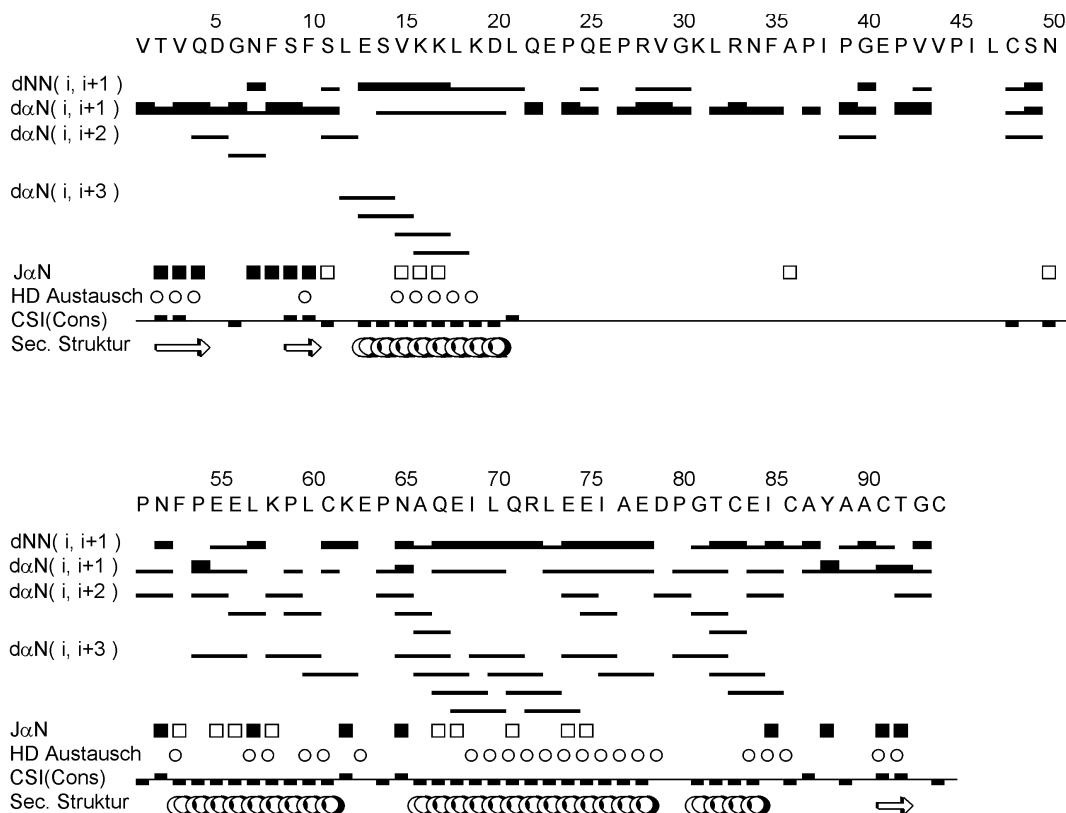


Abbildung 5.23: Auftragung der sekundärstrukturspezifischen NMR-Parameter von Proguanylin. Die aus den NOESY Spektren erhaltenen sequentiellen und mittelweitreichenden NOEs sind gegen die Sequenzposition aufgetragen (Kapitel 4.19.9). Die Balkendicke ist direkt proportional zur klassifizierten NOE-Intensität. Helix-typische Kopplungskonstanten ($J\alpha N < 6$ Hz) sind durch weiße, β -Faltblatt-typische Kopplungskonstanten ($J\alpha N > 8$ Hz) sind durch schwarze Quadrate und langsam austauschende Amidprotonen sind durch weiße Kreise dargestellt. Aufwärts, bzw. abwärts zeigende CSI Symbole zeigen einen Wert des Konsensus-Index von +1 bzw. -1 an. Die abgeleiteten Sekundärstrukturelemente sind dargestellt und entsprechen im Wesentlichen den später bei der Strukturberechnung erhaltenen.

Ausgehend von der sequenzspezifischen Zuordnung konnten im ^{15}N editierten 3D-NOESY Spektrum sekundärstrukturtypische NOE-Kreuzresonanzen identifiziert werden. In den helikalen Bereichen wurden neben den sequentiellen $\text{H}\alpha(i)$ $\text{HN}(i+1)$ auch die $\text{H}\alpha(i)$ $\text{HN}(i+2)$, $\text{H}\alpha(i)$ $\text{HN}(i+3)$ und $\text{HN}(i)$ $\text{HN}(i+1)$ Kreuzresonanzen gefunden, während in den Faltblättern die charakteristischen starken sequentiellen $\text{H}\alpha(i)$ $\text{HN}(i+1)$ NOE-Kreuzresonanzen beobachtet

wurden. Die Korrelation der NOE-Kreuzresonanzen bestätigte die aus den Verschiebungsindices, Kopplungskonstanten und langsam austauschenden Amidprotonen abgeleitete Sekundärstruktur. Alle die sequenzspezifische Sekundärstruktur definierenden NMR Parameter sind in Abbildung 5.23 nochmals zusammengefaßt und standen schon vor der eigentlichen Strukturberechnung zur Verfügung.

5.1.5.5 Messung des heteronuklearen $\{^1\text{H}\}^{15}\text{N}$ NOE

Für den Sequenzabschnitt von Gln22 bis Val44 wurden im ^{15}N -NOESY-HSQC intensive Austauschsignale mit der Wasserresonanz beobachtet, die auf einen schnellen Austausch der Amidprotonen mit dem Lösungsmittel hinweisen. Dementsprechend konnten unmittelbar nach dem Lösen von ^{15}N Proguanylin in D_2O für diese Reste auch keine Signale in den ^1H , ^{15}N -HSQC Spektren identifiziert werden. Zusammen mit den sekundären chemischen Verschiebungen und Kopplungskonstanten (Kapitel 5.1.5.4) deuteten diese Daten auf eine erhöhte intrinsische Flexibilität im Bereich von Gln22 bis Val44 hin. Um die Flexibilität dieses Bereichs nachzuweisen, wurde der heteronukleare $\{^1\text{H}\}^{15}\text{N}$ NOE gemessen (Abb. 5.24). Dazu wird ein ^1H , ^{15}N Spektrum einmal mit und einmal ohne Sättigung der Amidprotonen aufgenommen (Kapitel 4.19.3). Der heteronukleare NOE ergibt sich dann aus dem Intensitätsverhältnis der Signale des Experiments mit Vorsättigung zum Experiment ohne Sättigung.

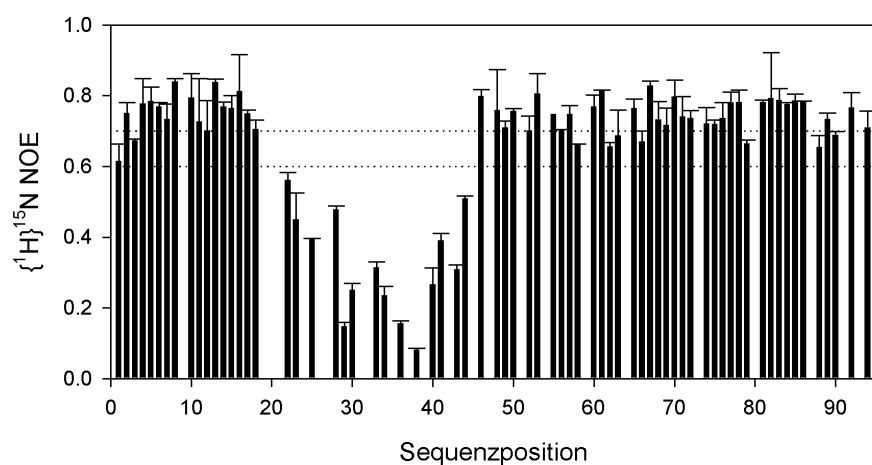


Abbildung 5.24: Der heteronukleare NOE von Proguanylin bei 600 MHz. Die Werte kleiner als 0,6 (untere gestrichelte Linie) weisen auf eine deutlich erhöhte Flexibilität der NH-Vektoren für den Bereich von Gln22 bis Val44 hin.

Für alle Amidprotonen von Gln22 bis Val44 ist der Wert des heteronuklearen NOE kleiner als 0,6, wobei Ile38 mit 0,08 den insgesamt niedrigsten Wert zeigt (Abb. 5.24). Werte des

heteronuklearen NOE kleiner als 0,6 sind ein eindeutiger Hinweis auf eine deutlich erhöhte interne Flexibilität der NH-Vektoren auf einer Pico- bis Nanosekunden-Zeitskala, die für unstrukturierte Bereiche typisch ist (Kay *et al.*, 1989). Als Resultat dieser deutlich erhöhten Flexibilität konnten für die Aminosäurereste 22 bis 44 praktisch keine NOE-Kreuzresonanzen identifiziert und für die anschließende Strukturberechnung verwendet werden (Kapitel 5.1.5.6, Abb. 5.26). Für die übrigen Bereiche von Proguanylin beträgt der mittlere heteronukleare NOE $0,74 \pm 0,05$ (Abb. 5.24). Diese Werte sind für Bereiche mit ausgeprägter Sekundär- bzw. Tertiärstruktur charakteristisch und schließen bei Proguanylin auch die bei vielen Proteinen flexiblen Termini mit ein.

5.1.5.6 Strukturberechnung auf Basis der NMR-Daten

Durch die iterative Zuordnung der NOE-Kreuzresonanzen in Kombination mit den Moleküldynamikrechnungen (Kapitel 4.20.2) konnten 591 Distanzintervalle bestimmt werden. Der zuvor erbrachte Monomernachweis für rekombinantes und natürliches Proguanylin (Kapitel 5.1.4.7) hat den intramolekularen Charakter dieser aus den NOESY Spektren abgeleiteten Abstandsbeschränkungen eindeutig bestätigt. Von den insgesamt 591 als Distanzbeschränkungen geeigneten NOE-Kreuzresonanzen wurden 457 durch Analyse des ^{15}N editierten 3D-NOESY Spektrums erhalten. Trotz der unvollständigen Zuordnung der ^{13}C Verschiebungen der Aminosäureseitenketten und der schlechten Unterdrückung der Wasserresonanz im ^{13}C -NOESY-HSQC konnten dennoch 65 eindeutige NOE-Kreuzresonanzen dieses Spektrums verwendet werden. Weitere, vor allem die Tertiärstruktur bestimmende Wechselwirkungen zwischen aromatischen und aliphatischen Aminosäuren wurden in Form von 69 eindeutigen NOE-Kreuzresonanzen aus den 2D-NOESY Spektren von natürlichem Proguanylin erhalten. Zusammen mit 30 sekundärstrukturtypischen $^3\text{J}(\text{HN}, \text{H}\alpha)$ Kopplungskonstanten (Kapitel 5.1.5.4) und 24 Wasserstoffbrücken (Kapitel 4.20.2, 5.1.5.4) konnten 645 experimentelle Randbedingungen für die abschließende Strukturberechnung verwendet werden (Tab. 5.1).

Von den insgesamt 120 berechneten Strukturen wurden die 40 Strukturen mit der niedrigsten Gesamtenergie ausgewählt und für die Verfeinerung verwendet (Kapitel 4.20.4). Als zusätzliche experimentelle Randbedingungen wurden dazu 55 residuale dipolare Kopplungen eingesetzt (Kapitel 4.20.4; Tab. 5.1). Die wichtigsten Parameter der Strukturberechnung von Proguanylin sind in Tabelle 5.1 zusammengefaßt.

Experimentelle Randbedingungen für die abschließende Strukturberechnung		
Interresiduale NOEs		547
	sequentiell ($ i - j = 1$)	257
	mittelweitreichend ($1 < i - j \leq 5$)	154
	weitreichend ($ i - j > 5$)	136
Intraresiduale NOEs		44
Beschränkung der Diederwinkel durch $^3J(\text{HN}, \text{H}\alpha)$		30
Wasserstoffbrückenbindungen (mit je 2 Distanzbeschränkungen)		24
Beschränkungen durch residuale dipolare Kopplungen		55
Statistik der Moleküldynamikrechnungen		
Durchschnittliche Energien (kcal/mol)		
	E_{tot}	183.69 (± 5.98)
	E_{bond}	5.32 (± 0.23)
	E_{angles}	141.46 (± 2.22)
	E_{improper}	14.05 (± 0.56)
	E_{repel}	12.49 (± 2.67)
	E_{NOE}	4.39 (± 1.19)
	E_{cdih}	0.14 (± 0.097)
	E_{dipo}	5.84 (± 1.31)
Abweichungen von der idealen Geometrie		
	Abstandsbeschränkungen	0.012 (± 0.0015) Å
	Bindungslängen	0.0048 (± 0.00039) Å
	Bindungswinkel	1.20° ($\pm 0.22^\circ$)
	Improperwinkel	0.45° ($\pm 0.0057^\circ$)
Standardabweichung von dipolaren H-N Kopplungen		0.65 (± 0.31) Hz
Abweichungen (RMSD) von der mittleren Struktur (Å)		
	Proteinrückgrat	alle schweren Atome
gesamte Struktur ^a	1.27	1.89
Val1 – Leu21, Ile46 – Cys94	0.69	1.14
Reguläre Sekundärstruktur ^b	0.40	0.90
SA _{RDC} v.s. SA _{noRDC} ^c	0.59	0.68

Tabelle 5.1: Zusammenfassung der wichtigsten Parameter der Strukturberechnung von Proguanylin. Mit Ausnahme der experimentellen Daten sind jeweils die Mittelwerte (\pm Standardabweichung) über die dreißig akzeptierten Strukturen angegeben. E_{tot} : Gesamtenergie; E_{bond} : Energiebeitrag der kovalenten Bindungen; E_{angles} : Energiebeitrag der Bindungswinkel; E_{improper} : Beitrag der Improperwinkel; E_{repel} : *repel*-Energie; E_{NOE} : Beitrag der Abstandsbeschränkungen; E_{cdih} : Beitrag der Diederwinkel; E_{dipo} : Beitrag der dipolaren Kopplungen. ^a Val1 bis Cys94; ^b Thr2-Gln4, Ser9-Phe10, Leu12-Lys17, Pro54-Lys62, Ala66-Glu78 und Cys91-Thr92; ^c SA_{noRDC}: Durchschnittsstruktur der 30 energieärmsten, ohne dipolare Kopplungen berechneten Strukturen, SA_{RDC}: Durchschnittsstruktur der 30 energieärmsten, mit dipolaren Kopplungen berechneten Strukturen (in beiden Fällen wurde die Durchschnittsstruktur für die Bereiche von Val1-Leu21 und Ile46-Cys94 berechnet).

Von den insgesamt 40 für die Verfeinerung eingesetzten Strukturen wurden 30 Strukturen aufgrund einer kleineren Gesamtenergie als 190 kcal/mol als konvergierte Strukturen akzeptiert und analysiert. Diese Strukturen zeigen nur eine geringe Streuung der Gesamtenergie und geringe Abweichungen der Bindungslängen von der idealen Geometrie (Tab. 5.1). Bei keiner der akzeptierten Strukturen waren die Verletzungen der maximalen Abstandsbeschränkungen größer als 0,3 Å und es gab keine systematischen Verletzungen um mehr als 0,13 Å. Die geringen Abweichungen der Abstandsbeschränkungen und Bindungslängen von der idealen Geometrie (Tab. 5.1) sind ein erstes Gütemerkmal der berechneten Strukturen, welches durch die Analyse der Torsionswinkel des Proteinrückgrats mit dem Programm PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993) bestätigt wird: 80,5 % der Aminosäuren nehmen im Ramachandran-Diagramm eine günstige Position ein und 18,5 % sind in zusätzlich erlaubten Bereichen zu finden.

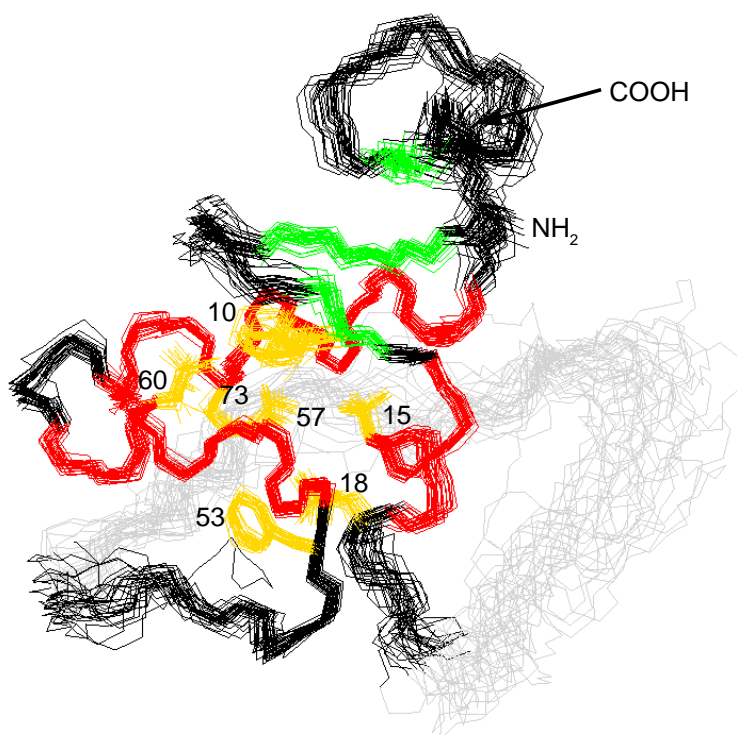


Abbildung 5.25: Überlagerung der 30 energetisch günstigsten Strukturen von Proguanylin. Die Darstellung zeigt den Verlauf des Proteinrückgrats jeder Struktur. Helikale Bereiche sind in rot, Faltblattstränge in grün und Bereiche mit einem heteronuklearen $\{^1\text{H}\}^{15}\text{N}$ NOE < 0,6 sind in grau dargestellt. Die Seitenketten der an der Ausbildung des hydrophoben Kerns beteiligten aromatischen und aliphatischen Aminosäuren (Phe10, Val15, Leu18, Phe53, Leu57, Leu60 und Leu73) sind in gelb gezeigt. Die Termini sind mit NH_2 und COOH bezeichnet.

Die Überlagerung der 30 akzeptierten Strukturen (Abb. 5.25; Tab. 5.1) liefert eine Abweichung (RMSD) von der mittleren Struktur von 1,27 Å für die schweren Atome des Proteinrückgrats ($\text{C}\alpha$, CO , N) und 1,89 Å für alle schweren Atome. Nimmt man die flexiblen Aminosäurereste (Gln 22-Pro45; Kapitel 5.1.5.5) von der Berechnung der mittleren Struktur aus, verbessert sich die Abweichung auf 0,69 Å für das Proteinrückgrat und auf 1,14 Å für alle schweren Atome. Die geringsten Abweichungen werden mit 0,40 Å für die

Rückgratratome und $0,90 \text{ \AA}$ für alle schweren Atome für Elemente mit regulärer Sekundärstruktur erhalten (Abb. 5.25; Tab. 5.1).

Ein Vergleich der Verteilung der aus den NOESY Spektren erhaltenen experimentellen Abstandsbeschränkungen mit den Abweichungen von der mittleren Struktur entlang der Aminosäuresequenz zeigt für den schlecht definierten Bereich von Gln22 bis Leu47 (Abb. 5.25, grau dargestellt) das fast vollständige Fehlen von mittelweitreichenden und weitreichenden Distanzbeschränkungen (Abb. 5.26). Diese experimentelle Unterbestimmung korreliert mit einer deutlich erhöhten internen Flexibilität der N-H-Vektoren in dieser Region (Kapitel 5.1.5.5; Abb. 5.24).

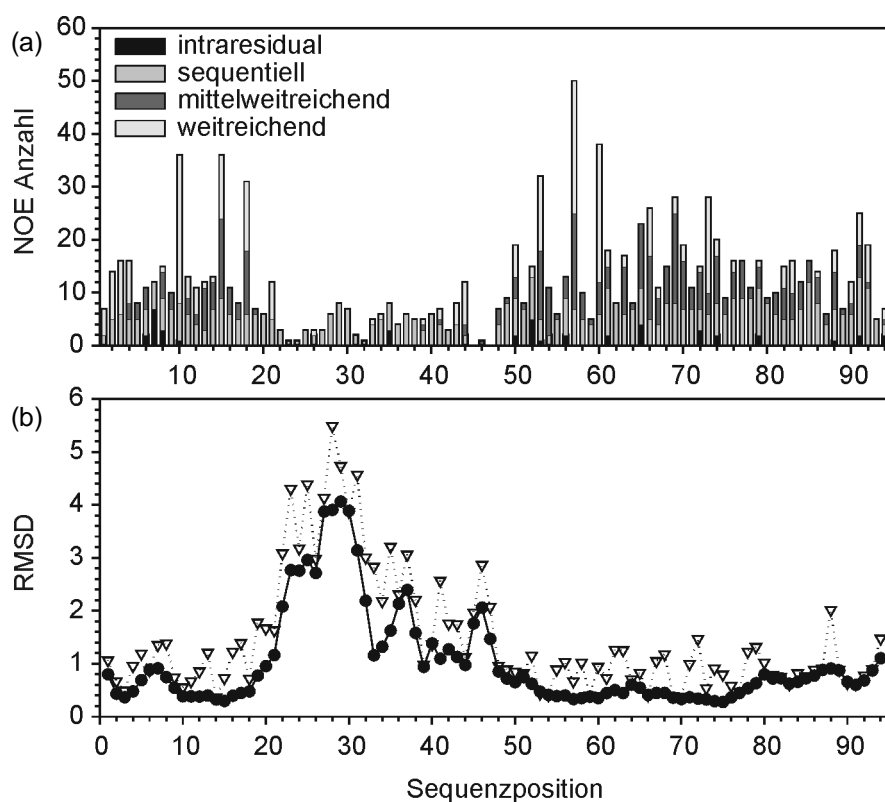


Abbildung 5.26: Verteilung der experimentellen Abstandsbeschränkungen und Abweichungen von der mittleren Struktur entlang der Aminosäuresequenz. (a) Dargestellt sind die intraresidualen, sequentiellen, mittel- und weitreichenden Distanzbeschränkungen pro Aminosäure. (b) Die Abweichungen der Rückgratratome (schwarze Kreise) und aller schweren Atome (weiße Dreiecke) sind für jede Aminosäure gezeigt. Die dabei zugrunde gelegte Durchschnittsstruktur wurde für Elemente mit regulärer Sekundärstruktur berechnet (Thr2-Gln4, Ser9-Phe10, Leu12-Lys17, Pro54-Lys62, Ala66-Glu78 und Cys91-Thr92).

Aufgrund der großen Anzahl an experimentellen Randbedingungen wurde die geringste Streuung der Atomkoordinaten für Elemente mit regulärer Sekundärstruktur beobachtet (Abb. 5.25 und 5.26). Die Präzision dieser Strukturelemente wurde durch die Verfeinerung mit

dipolaren Kopplungen als zusätzliche experimentelle Randbedingungen erreicht: Im Vergleich zu den ohne dipolare Kopplungen berechneten Strukturen verbesserte sich der RMSD der Rückgrat-atome von 0,43 Å (ohne dipolare Kopplungen) auf 0,40 Å. Gleichzeitig verbesserte sich die Verteilung der Torsionswinkel des Proteinrückgrats, die zu einer Erhöhung des Anteils mit günstigen Positionen im Ramachandran-Diagramm von 79 % auf 80,5 % führte. Ein Vergleich der mit und ohne Berücksichtigung der dipolaren Kopplungen berechneten Strukturen liefert eine Abweichung von 0,59 Å der jeweiligen mittleren Strukturen (Abb. 5.27, (a)). Die Orientierungen der N-H-Vektoren bestätigen daher den durch die übrigen NMR-Parameter definierten Verlauf des Proteinrückgrats von Proguanylin.

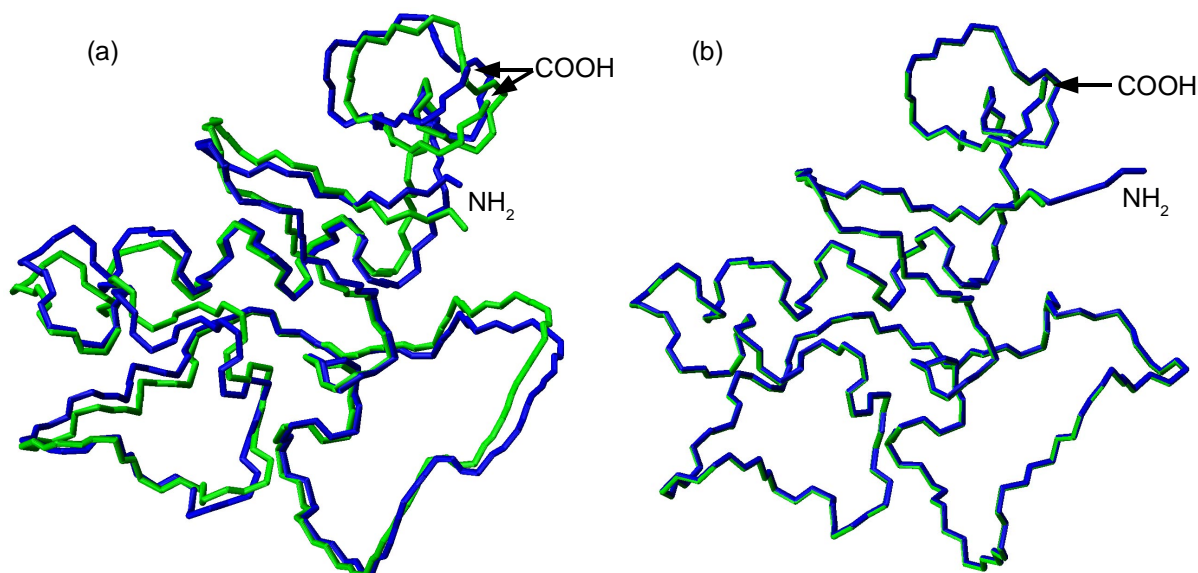


Abbildung 5.27: Schematische Darstellung des Rückgratverlaufs der Proguanylin-Struktur. (a) Vergleich der mittleren, mit (blau) bzw. ohne (grün) Verfeinerung durch dipolare Kopplungen berechneten Strukturen (jeweils für die Bereiche Val1-Leu21 und Ile46-Cys94 berechnet). (b) Überlagerung einer ausgewählten Proguanylin-Struktur, vor (grün) und nach (blau) NH₂-terminaler Addition der Gly-Pro-Sequenz. In beiden Darstellungen sind die Termini markiert (NH₂ und COOH).

Für die Berechnung der dreidimensionalen Struktur wurden Abstandsbeschränkungen aus den NOESY Spektren von rekombinantem und natürlichem Proguanylin verwendet. Daher wurde, wie bereits erwähnt, bei der Strukturberechnung auf die zusätzliche NH₂-terminale Gly-Pro-Sequenz von rekombinantem Proguanylin verzichtet und die Sequenz des natürlichen Proteins zugrunde gelegt. Um einen sterischen Einfluß dieser beiden Aminosäuren auf die Proguanylin-Struktur auszuschließen, wurden sie mit dem Programm SYBYL (Tripos Inc.) am NH₂-Terminus angefügt und die Strukturen energieminiert. Bei der Überlagerung einer

ausgewählten mit einer NH₂-terminal verlängerten Struktur sind keine Veränderungen zu sehen (Abb. 5.27, (b)), so daß ein Einfluß der Gly-Pro-Sequenz ausgeschlossen werden kann.

5.1.5.7 Die Struktur von Proguanylin in Lösung

Die schematische Darstellung einer aus der akzeptierten Schar ausgewählten Struktur zeigt die mit dem Programm PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993) identifizierte Elemente regulärer Sekundärstruktur (Abb. 5.28 (a)). Die Struktur von Proguanylin in Lösung weist drei zu einem Bündel zusammengelagerte α -Helices und ein kurzes, dreisträngiges, antiparalleles β -Faltblatt auf. Dieses führt zu einer unmittelbaren Nachbarschaft der Termini und wird durch zwei NH₂-terminale (Thr2-Gln4, Ser9-Phe10; Abb. 5.28, (a), β 1+2) und einen COOH-terminalen Strang (Cys91-Thr92; β 3) gebildet und durch Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert (Thr2(HN) – Thr92(O); Thr92(HN) – Thr2(O); Gln4(HN) – Ala90(O); Val3(HN) – Phe10(O); Phe10(HN) – Val3(O)). Die α -Helices erstrecken sich von Leu12 bis Lys17 (α 1), von Leu57 bis Lys62 (α 2) und von Ala66 bis Glu78 (α 3) und wurden durch einige charakteristische H α HN(i+4) NOE-Kreuzresonanzen als solche verifiziert. Eine zusätzliche 3_{10} -helikale Windung erstreckt sich von Pro54 bis Glu56 und grenzt damit NH₂-terminal direkt an Helix 2 an.

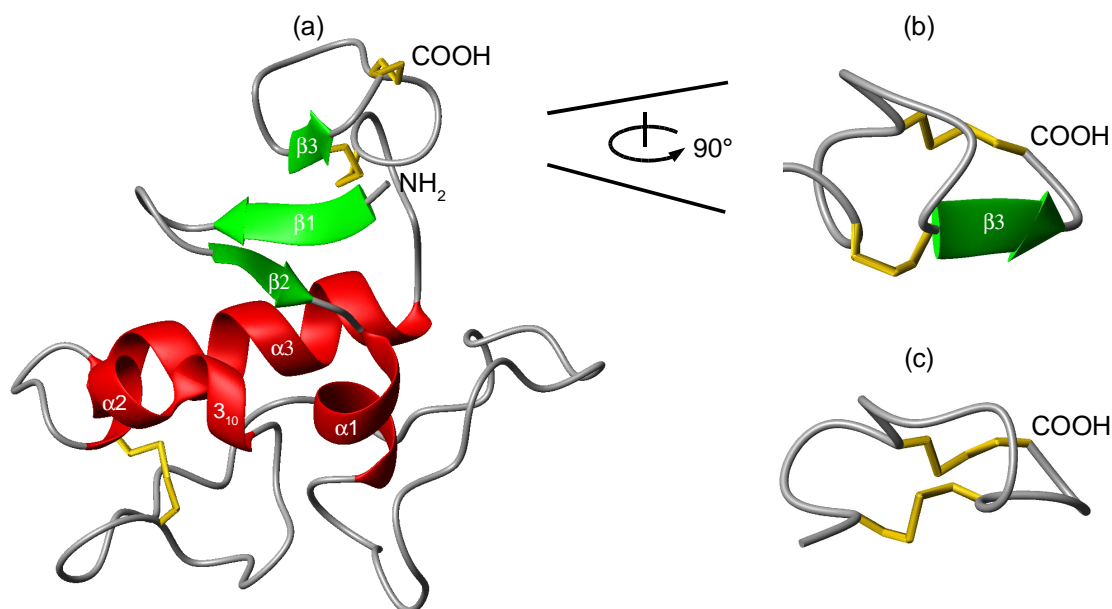


Abbildung 5.28: (a) Schematische Darstellung der Proguanylin-Struktur. Helikale Elemente sind in rot, die Faltblattstränge in grün und die disulfidverbrückten Cysteinreste (48 – 61, 83 – 91, 86 – 94) sind in gelb dargestellt. (b) Vergrößerung der Hormonregion von Proguanylin. Zum Vergleich ist in (c) die Struktur des Guanylin A-Isomers gezeigt (nach Skelton *et al.*, 1994; PDB Eintrag 1gna).

Die relative Orientierung der Sekundärstrukturelemente zueinander wird durch die Ausbildung eines hydrophoben Kerns unter Beteiligung der Seitenketten von Phe10, Val15, Leu18, Phe53, Leu57, Leu60 und Leu73 bestimmt (Abb. 5.25). Dementsprechend kann für diese Aminosäuren auch die größte Anzahl weitreichender NOE-Kontakte beobachtet werden (Abb. 5.26, (a)). Kontakte zwischen den Seitenketten von Val15 und Leu18 mit denen von Leu57, Leu60 und Leu73 dienen als Hauptankerpunkte für die Orientierung der Helices zueinander. Die Lage des β -Faltblattes bezüglich den übrigen Strukturelementen wird vor allem durch Schlüsselkontakte zwischen den NH_2 -terminalen Strängen mit den Helices 2 und 3 unter Einbeziehung der Seitenketten von Phe10 (β_2), Leu57, Leu60 (α_2) und Leu73 (α_3) bestimmt. Die beschriebenen Wechselwirkungen der Aminosäuren des hydrophoben Kerns führen zu einer Packung der aliphatischen Seitenkette von Leu57 zwischen die aromatischen Seitenketten von Phe10 und Phe53 (Abb. 5.25) und erklären die in den Spektren beobachtete starke Hochfeldverschiebung der δ -Methylgruppen von Leu57 (HD1*: 0,213 ppm; HD2*: -0,072 ppm; vgl. Abb. 5.11).

Basierend auf der Analyse der chemischen Verschiebungen der Hormonregion von Proguanylin (Reste 80-94) wurde bereits auf eine A-Form ähnliche Topologie dieses Bereichs geschlossen (Kapitel 5.1.5.3). Die Orientierung der topologiebestimmenden Reste Ala87 bis Ala90 bezüglich der Lage der Disulfidbrücken (Cys83 – Cys91, Cys86 – Cys94) ist in der Proguanylin-Struktur mit der für das A-Isomer typischen Orientierung vergleichbar (Abb. 5.28, (b, c)). Dementsprechend ist die Abweichung der mittleren Strukturen der Proguanylinreste 82 bis 94 (Abb. 5.28, (b)) und des Guanylin A-Isomers (Abb. 5.28, (c); PDB Eintrag 1gna) 1,62 Å, während die Abweichung zur Guanylin B-Form (PDB Eintrag 1gnb) 5,09 Å ist. Das Vorliegen einer helixtypischen Schleife von Thr82 bis Glu84 (Abb. 5.28, (a, b)) und eines Faltblattstrangs (Cys91-Thr92; Abb. 5.28, β_3) in der Hormonregion von Proguanylin führen zu einer deutlichen Hochfeld- bzw. Tieffeldverschiebung der jeweiligen $^1\text{H}\alpha$ Resonanzen und erklären die im Vergleich mit den isolierten Guanylin-Isomeren beobachteten auffälligen Unterschiede der sekundären chemischen Verschiebungen in diesen Bereichen (Kapitel 5.1.5.3; Abb. 5.20).

Die Atomkoordinaten der Proguanylin-Struktur wurden in der PDB Datenbank (<http://www.rcsb.org/pdb/>) zusammen mit den experimentellen Randbedingungen der Strukturberechnung unter der Zugriffsnummer 1o8r hinterlegt und die meisten der bislang vorgestellten Ergebnisse sind bereits publiziert (Lauber *et al.*, 2002, Lauber *et al.*, 2003).

5.2 Mutationsstudien an Proguanylin

Bei der Strukturbestimmung von Proguanylin war eine 23 Aminosäuren lange, flexible, unstrukturierte Region aufgefallen, deren Ende durch eine Disulfidbrücke (Cys48 – Cys61) begrenzt wird (Abb. 5.25 und 5.28). Der Einfluß dieser flexiblen Region und der genannten Disulfidbrücke auf die Struktur des Prohormons und auf die Ausbildung der nativen Disulfidverbrückung des Hormonteils wurde durch entsprechende Mutationen und anschließende Charakterisierung der veränderten Proteine untersucht. Außerdem sollte die Analyse einer weiteren Proguanylin-Mutante (Proguanylin-C86S/C94S) Hinweise über den Einfluß der Faltung der Prosequenz auf die Struktur der Hormonregion liefern.

5.2.1 Klonierungen

5.2.1.1 Proguanylin- Δ (28-37) und Proguanylin-C48S/C61S

Für die Deletion der Aminosäuren Arg28 bis Pro37, bzw. für die Substitution von Cys48 und Cys61 durch Serin wurde die *splicing-by-overlap-extension*-PCR-Mutagenese angewandt (Kapitel 4.8.3). Als Matrize diente der Expressionsvektor pET-32a-Asp-pres-*proguanylin* (Kapitel 5.1.1.2 und 3.2), die verwendeten Primer waren die Oligonukleotide asp-pres-progua5' (Primer 1), deletion_progua_3' bzw. progua_C48S_3' (Primer 3), deletion_progua_5' bzw. progua_C61S_5' (Primer 4) und progua_3' (Primer 2; für alle Primer: siehe Kapitel 3.3). Nach allen PCR-Schritten wurden die Produkte mittels Agarosegelelektrophorese (Kapitel 4.3.1) getrennt und die entsprechenden Banden extrahiert (Kapitel 4.6.3). Anschließend wurde die mutierte DNA gleichzeitig mit *Bgl*II und *Nco*I restringiert (Kapitel 4.7.1), in doppelt verdauten, dephosphorylierten pET-32a ligiert (Kapitel 4.7.3) und nach Butanolfällung (Kapitel 4.6.1) in elektrokompente *E. coli* Top10-Zellen (Kapitel 3.1.1) eingebracht (Kapitel 4.9.2). Nach Kolonie-PCR (Primer: Oligonukleotide asp-pres-progua5' und progua_3') der *E. coli* Top10-Transformanten und Isolierung der Plasmid-DNA (Kapitel 4.5) wurde die richtige Nukleotidsequenz der Expressionsvektoren pET-32a-pres-*proguanylin*- Δ (28-37) und pET-32a-pres-*proguanylin*-c48s/c61s durch Sequenzierung (Kapitel 4.7.4) bestätigt (vgl. Kapitel 10.1.6, 10.1.7).

5.2.1.2 Proguanylin-C86S/C94S

Der relativ geringe Abstand zwischen den zu substituierenden Nukleotiden ermöglichte die Verwendung eines einzigen Mutageneseprimers für beide Mutationen. Daher wurde für die Substitution von Cys86 und Cys94 zu Serin die *QuickChange*-PCR-Mutagenese (Kapitel 4.8.4) angewandt. Als Matrize diente der Expressionsvektor pET-32a-Asp-pres-*proguanylin* (Kapitel 5.1.1.2 und 3.2) und als Primer das Oligonukleotid progua_C86S/C94S_3' (Kapitel 3.3). Nach Isolierung der Plasmid-DNA (pET-32a-pres-*proguanylin-c86s/c94s*) (Kapitel 4.5) aus *E. coli* Top10-Transformanten wurde die richtige Nukleotidsequenz durch Sequenzierung (Kapitel 4.7.4) bestätigt (vgl. Kapitel 10.1.8).

5.2.2 Expression und Reinigung

Die Expression von Proguanylin- Δ (28-37), Proguanylin-C48S/C61S und Proguanylin-C86S/C94S erfolgte ebenfalls als Thioredoxin-Fusionsprotein in *E. coli* AD494(DE3)-Zellen (Kapitel 4.11.2, 5.1.2 und 5.1.3). Im Unterschied zum Wildtyp-Protein und den beiden anderen Mutanten mußte die Induktion von Proguanylin-C48S/C61S bei 25 °C und über Nacht durchgeführt werden, um ausreichende Mengen an löslichem Fusionsprotein zu erhalten. Die Reinigung aller Proguanylin-Mutanten erfolgte dann wie bereits beschrieben (Kapitel 4.11.2 und 5.1.3). Für die nachfolgende Charakterisierung wurde als abschließender Reinigungsschritt ebenfalls eine präparative RP-HPLC durchgeführt (Kapitel 4.13.3). Als Beispiel für eine typische Reinigung der genannten Proguanylin-Varianten ist die Reinigung von Proguanylin- Δ (28-37) in Abbildung 5.29 zusammengefaßt.

Die Ausbeuten je Liter Bakterienkultur (2,5-3 g Naßzellgewicht) waren für die unterschiedlichen Proguanylin-Varianten etwa 5-6,3 mg (LB und M9) für Proguanylin- Δ (28-37), etwa 4,5 mg (LB) und 1-2 mg (M9) für Proguanylin-C48S/C61S und etwa 7 mg (LB) und 2-4 mg (M9) für Proguanylin-C86S/C94S. Damit waren die Ausbeuten ähnlich gut oder sogar besser als für das Wildtyp-Protein, lediglich für Proguanylin-C48S/C94S waren die Ausbeuten etwas schlechter (vgl. Kapitel 5.1.3.4 und 5.1.3.5).

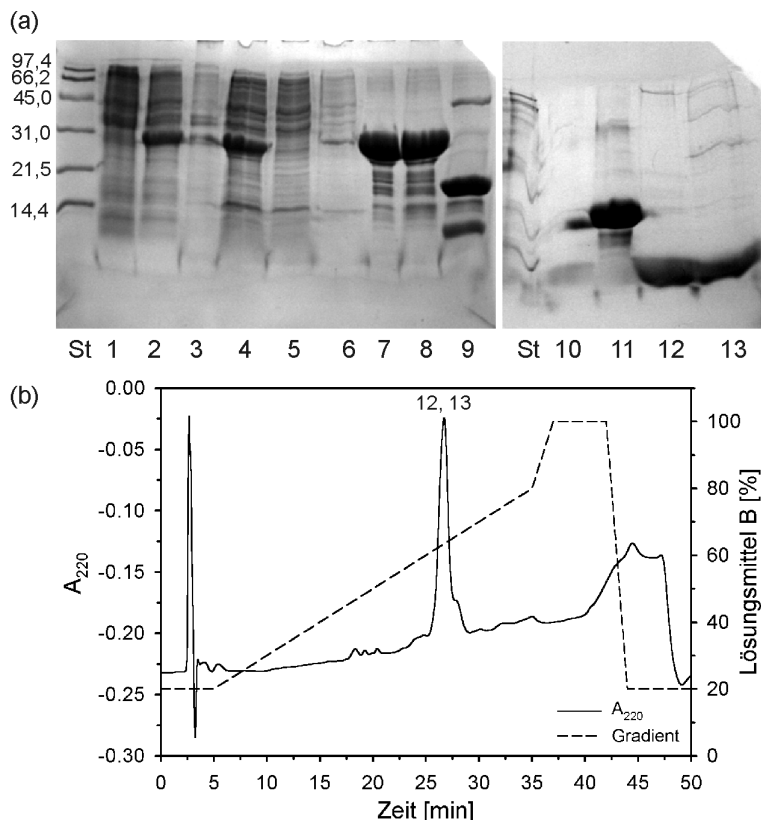


Abbildung 5.29: (a) 19 %-ige SDS-Gele einer typischen Reinigung von Proguanylin- $\Delta(28-37)$. Das Fusionsprotein (Trx-Pres-Proguanylin- $\Delta(28-37)$) wurde von der Säule eluiert (Bahn 7), und Proguanylin- $\Delta(28-37)$ (Bahn 10) konnte nach PreScission-Spaltung von ungespaltenem Fusionsprotein und Trx-tag (Bahn 11) getrennt werden. Nach einer anschließenden RP-HPLC an einer C_{18} -Säule (b) wurde sehr reines Protein für die weitere Charakterisierung erhalten ((a), Bahnen 12+13). Bahn 1: vor Induktion; Bahn 2: 3 h nach Induktion; Bahn 3: Zelltrümmer nach Aufschluß; Bahn 4: Rohextrakt; Bahn 5: Säulendurchfluß; Bahn 6: Waschen mit

Auftragspuffer; Bahn 7: Elution; Bahn 8: Fusionsprotein vor PreScission-Spaltung; Bahn 9: nach Spaltung; Bahn 10: Säulendurchfluß nach Spaltung; Bahn 11: Waschen mit Elutionspuffer; Bahnen 12+13: Hauptfraktion der HPLC-Reinigung; St: *low range*-Protein-standard (in kDa).

5.2.2.1 Massenspektrometrie

Die Molekulargewichte aller Proguanylin-Mutanten wurden durch die Aufnahme von Elektrospray-Massenspektren (Kapitel 4.16) bestätigt. Die Homogenität der Spektren war gleichzeitig ein Indiz für die Reinheit der Proteine.

In Abbildung 5.30 sind die Massenspektren von ^{15}N Proguanylin- $\Delta(28-37)$, Proguanylin-C48S/C61S (M: 10461 Da) und Proguanylin-C86S/C94S (M: 10461 Da) wiedergegeben. Im Fall von Proguanylin- $\Delta(28-37)$ (M: 9351,6 Da) wurde gleichzeitig die erfolgreiche ^{15}N Markierung nachgewiesen, da die Berücksichtigung der Stickstoffatome der Seitenketten des Aginin-, sowie der fünf Lysin-, vier Asparagin- und fünf Glutaminreste und den 86 Amidstickstoffatomen des Proteinrückgrats ein Molekulargewicht von 9454,6 Da erwarten ließ (Abb. 5.30, (a); $M^+ = 9454,6$).

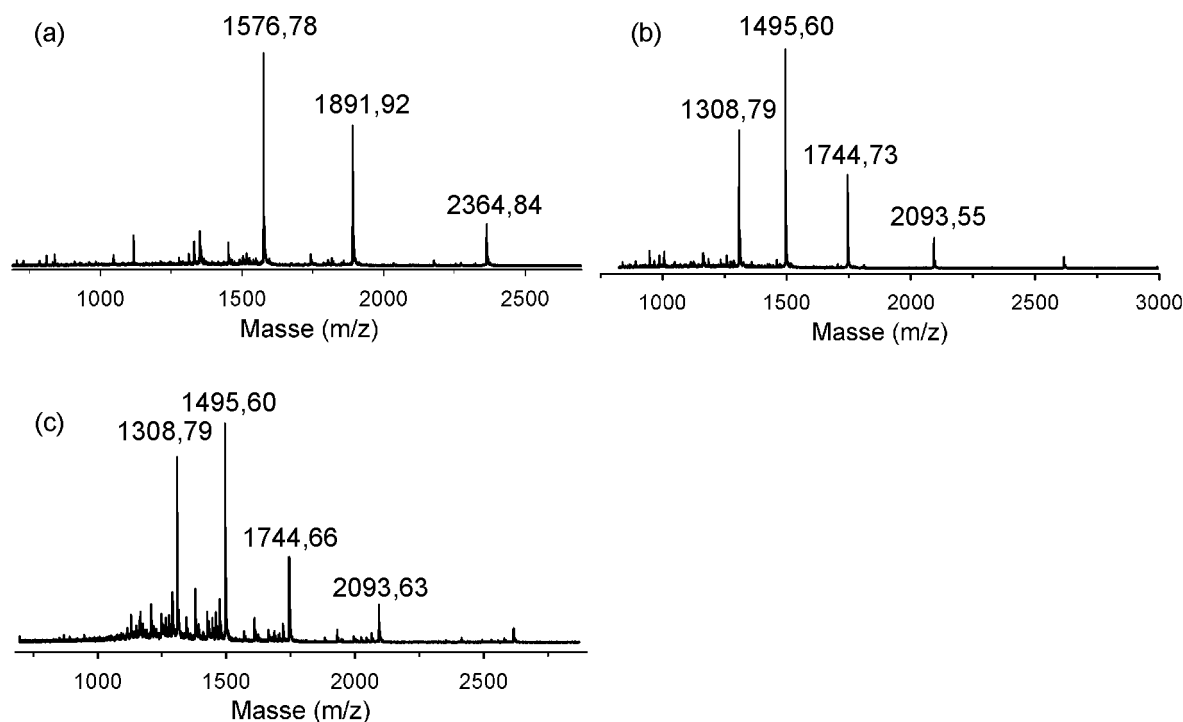
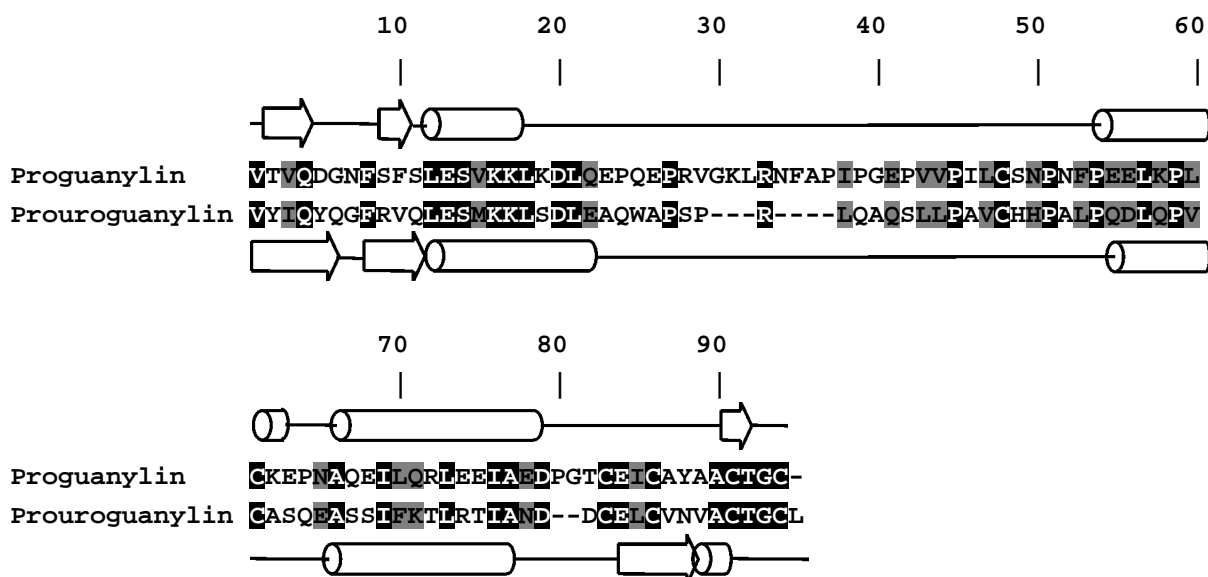


Abbildung 5.30: ESI-Massenspektren von ^{15}N Proguanylin- $\Delta(28-37)$ ((a); $M^+ = 9545,6$ Da), Proguanylin-C48S/C61S ((b); $M^+ = 10462,2$) und Proguanylin-C86S/C94S ((c); $M^+ = 10462,2$).

5.2.3 Proguanylin- $\Delta(28-37)$

Ebenso wie für Proguanylin wurde für den Assoziationsgrad des verwandten Prohormons Prouroguanylin ein stabiles Dimer postuliert (Hidaka *et al.*, 2000), das im Fall von Proguanylin in dieser Arbeit bereits widerlegt wurde (Kapitel 5.1.4.7). Beide Proteine besitzen eine Sequenzidentität von 35 % und unterscheiden sich im Wesentlichen durch eine Deletion von sieben Aminosäuren im mittleren Sequenzabschnitt von Proguanylin (Abb. 5.31).

Die betroffene Sequenz entspricht gleichzeitig dem Bereich mit der geringsten Sequenzidentität beider Proteine und ist in der flexiblen, unstrukturierten Region der Proguanylin-Struktur lokalisiert. Daher erschien ein für die Struktur von Proguanylin essentieller Beitrag dieses Sequenzabschnitts unwahrscheinlich. Da ein möglicher Einfluß auf den Assoziationsgrad jedoch nicht ausgeschlossen werden konnte, wurde die entsprechende Sequenz aus Proguanylin deletiert und der Assoziationsgrad, sowie die Struktur des mutierten Proteins untersucht. Mit den Resten Arg28 bis Pro37 war der zur Deletion ausgewählte Bereich etwas größer als die oben beschriebene Differenz zwischen Proguanylin und Prouroguanylin und beinhaltete die nicht-konservierten Positionen Arg28 und Val29 (vgl. Abb. 5.31).



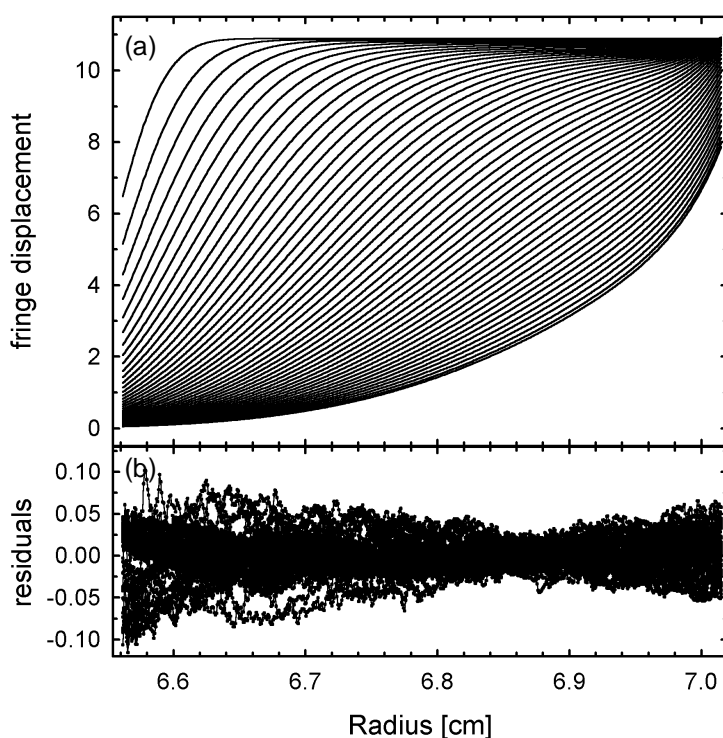


Abbildung 5.32: Sedimentationsgeschwindigkeits-Experiment mit Proguanylin- $\Delta(28-37)$. (a) Die gemessenen Brechungsindexverschiebungen (*fringe displacement*) wurden gegen den Abstand vom Rotormittelpunkt aufgetragen. Aus Gründen der Übersichtlichkeit ist nur jeder dritte der 150 für die Analyse verwendeten *scans* dargestellt. Für die Anpassung der Daten an Gleichung 4.13 und 4.14 (RMSD = 0,022) wurde ein Verhältnis der Reibungskoeffizienten von $f/f_0 = 1,30$ bestimmt. (b) Differenzen zwischen experimentellen und angepassten Daten (*residuals*) als Funktion des Abstands vom Rotormittelpunkt. Meßbedingungen: Die Zentrifugation wurde bei 20 °C und 60000 rpm durchgeführt.

Die Detektion der Brechungsindexverschiebungen erfolgte alle 90 s über einen Zeitraum von 4 h. Ausgangskonzentration: 450 μM ; Puffer: 50 mM Natrium-Phosphat/50 mM NaCl, pH 7,4.

In den entsprechenden Sedimentationskoeffizienten- bzw. Molekulargewichtsverteilungen (Gleichung 4.13, 4.14) wird jeweils nur eine Komponente mit einem Sedimentationskoeffizienten von 1,19 S, einem dem Monomer entsprechenden Molekulargewicht von 9818 Da, einem Diffusionskoeffizienten von $1,13 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ und einem Verhältnis der Reibungskoeffizienten f/f_0 von 1,30 identifiziert (Abb. 5.33). Die erhaltenen Werte für den Diffusionskoeffizienten und f/f_0 liegen zwischen denen des natürlichen und rekombinanten Wildtyp-Proteins (Kapitel 5.1.4.7).

Die Qualität der an das Sedimentationsgeschwindigkeits-Experiment der 900 μM konzentrierten Probe angepassten Daten war schlechter als die der niedrigeren Konzentration (nicht abgebildet). Der Grund dafür war vermutlich die durch die hohe Konzentration bedingte einsetzende Einschränkung der Idealität der Lösung (vgl. Kapitel 5.1.4.7). Dennoch konnten die oben beschriebenen Ergebnisse über das Vorliegen eines Monomers in Lösung eindeutig bestätigt werden. So ergab sich bei der höheren Konzentration ein Sedimentationskoeffizient von 1,16 S und ein Molekulargewicht von 9985 Da (Abb. 5.33).

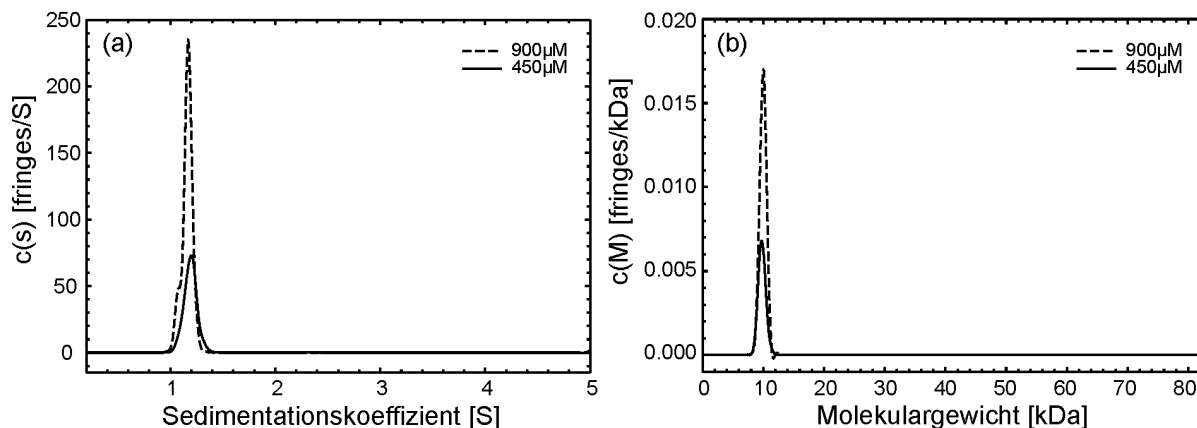


Abbildung 5.33: Analyse der molekularen Größenverteilung von Proguanylin- $\Delta(28-37)$. Die berechneten Sedimentationskoeffizienten- $c(s)$ (a), bzw. Molekulargewichtsverteilungen $c(M)$ (b) sind gegen die Sedimentationskoeffizienten, bzw. Molekulargewichte aufgetragen. Beide Verteilungen wurden mit einem Konfidenzniveau der Regularisierung nach der Maximum-Entropie-Methode von $p = 0,95$, einem Verhältnis f/f_0 von 1,30 (450 μM) bzw. 1,35 (900 μM) und einer Auflösung von $n = 100$ Sedimentationskoeffizienten oder molekularen Massen berechnet (Kapitel 4.17.2). Meßbedingungen: vgl. Abb. 5.32; Ausgangskonzentration: 450 μM (durchgezogene Linien) bzw. 900 μM (gestrichelte Linien).

Die bei beiden Konzentrationen (450 μM und 900 μM) und unterschiedlichen Rotorgeschwindigkeiten (20000 rpm und 25000 rpm) durchgeführten Sedimentationsgleichgewichts-Experimente bestätigen die Ergebnisse der Sedimentationsgeschwindigkeits-Experimente. Bei allen Experimenten ist eine zufällige Verteilung der Differenzen zwischen experimentellen und berechneten Werten zu sehen (Abb. 5.34, (b)), die die Qualität der an Gleichung 4.5 angepaßten Daten widerspiegelt. Für die Probe mit der geringeren Konzentration wurde diese Genauigkeit (RMSD = 0,018 bzw. 0,017; Abb. 5.34, schwarze und rote Linien) erreicht, wenn das tatsächliche Molekulargewicht von 9351 Da vorgegeben und ein Anteil von 8 % (20000 rpm) bzw. 0,4 % (25000 rpm) einer hochmolekularen Verunreinigung (M: 26 kDa, bzw. 111 kDa) akzeptiert wurde. Aus den Daten der 900 μM konzentrierten Probe ergaben sich Molekulargewichte der sedimentierenden Moleküle von 8907 Da (20000 rpm) und 9419 Da (25000 rpm) (Abb. 5.34, blaue und türkise Linien; RMSD = 0,016 bzw. 0,018), die das tatsächliche Molekulargewicht von 9351,6 Da sehr gut beschreiben.

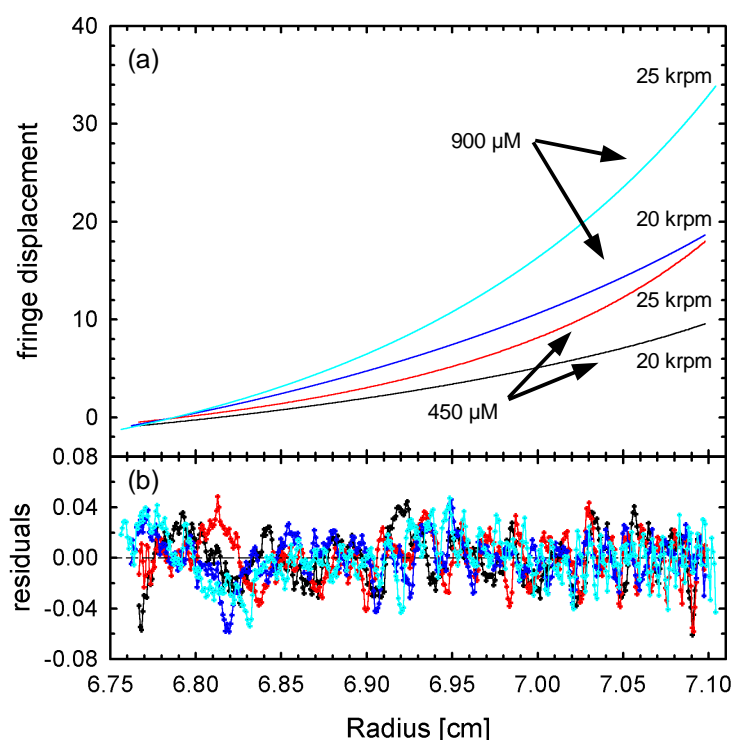


Abbildung 5.34: Sedimentationsgleichgewichts-Experimente mit Proguanylin- $\Delta(28-37)$ (450 μM bzw. 900 μM in 50 mM Natrium-Phosphat/50 mM NaCl, pH 7,4). (a) Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind nur die an Gleichung 4.5 angepaßten Brechungsindexverschiebungen (*fringe displacement*) dargestellt (RMSD = $0,017 \pm 0,001$). (b) Differenzen zwischen experimentellen und angepaßten Daten (*residuals*) als Funktion des Abstandes vom Rotormittelpunkt. Meßbedingungen: Das Sedimentationsgleichgewicht wurde durch Zentrifugation für mindestens 20 h bei 20 °C und 20000 rpm (schwarze und blaue Linien) bzw. 25000 rpm (rote und türkise Linien) erreicht.

Die durchgeführten Sedimentationsexperimente konnten eindeutig nachweisen, daß Proguanylin- $\Delta(28-37)$, wie die Wildtyp-Proteine, auch im millimolaren Konzentrationsbereich als Monomer in Lösung vorliegt. Trotz der Deletion von zehn Aminosäuren bleibt die Molekülform (f/f_0) und somit der Diffusionskoeffizient im Vergleich zu den Wildtyp-Proteinen praktisch unverändert.

5.2.3.2 CD-Spektroskopie

Fern-UV-CD-Spektren von Proguanylin- $\Delta(28-37)$ dienen zum Vergleich der Sekundärstrukturanteile der Deletionsmutante mit denen des rekombinanten Wildtyp-Proteins (Abb. 5.35).

Der Verlauf des Spektrums von Proguanylin- $\Delta(28-37)$ entspricht im Wesentlichen dem des Wildtyp-Proteins (Abb. 5.35, (a)). Dennoch fallen abgesehen von einem gemeinsamen Nulldurchgang für die übrigen Bereiche der Spektren deutliche Unterschiede auf, in denen für die Deletionsmutante etwas größere Signalintensitäten beobachtet werden. Diese Elliptizitätsänderungen, zusammen mit einer leichten Verschiebung des absoluten Minimums von etwa 204 nm für das Wildtyp-Protein zu größeren Wellenlängen (etwa 206 nm) bei Proguanylin- $\Delta(28-37)$, weisen auf eine Zunahme der Anteile mit regulärer Sekundärstruktur hin. Da die Deletion ausschließlich auf die unstrukturierte Region der Proguanylin-Struktur beschränkt ist

und etwa 10 % der Proguanylin-Sequenz umfaßt, entsprechen die beobachteten Unterschiede zwischen den CD-Spektren von Proguanylin und Proguanylin- $\Delta(28-37)$ den theoretischen Erwartungen.

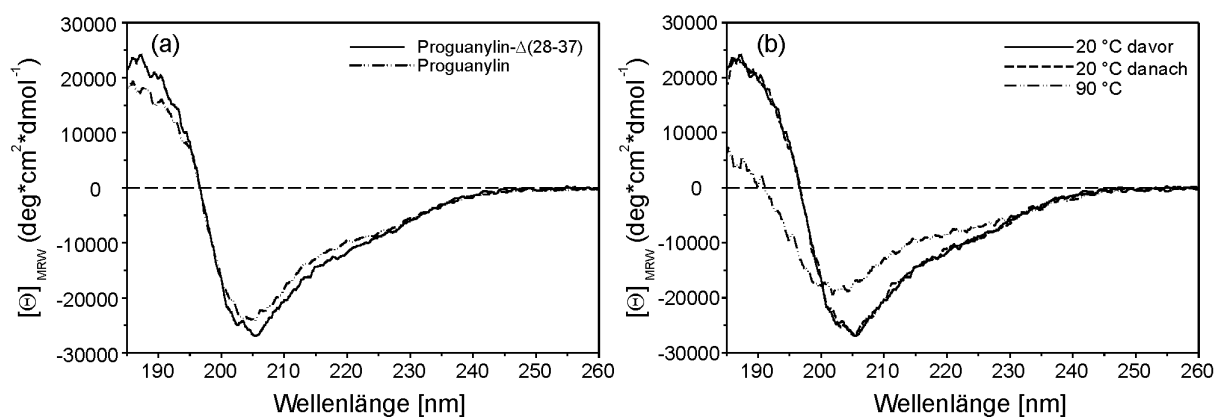


Abbildung 5.35: Fern-UV-CD-Spektren von rekombinantem Proguanylin- $\Delta(28-37)$. (a) Vergleich der Spektren von Proguanylin- $\Delta(28-37)$ und Wildtyp-Proguanylin. (b) Für die Aufnahme von CD-Spektren bei verschiedenen Temperaturen wurde die Probe schnell aufgeheizt bzw. wieder abgekühlt. Meßbedingungen: 6,5 μ M Proguanylin- $\Delta(28-37)$ in 10 mM Kalium-Phosphat, pH 6,0. Schichtdicke der Küvette: 1 mm. Davor: vor dem Aufheizen; danach: nach dem Abkühlen.

Um den Einfluß der Temperatur auf die Sekundärstruktur von Proguanylin- $\Delta(28-37)$ zu untersuchen, wurden CD-Spektren bei Raumtemperatur (20 °C) vor dem Aufheizen bzw. direkt nach dem Abkühlen und bei 90 °C aufgenommenen (Abb. 5.35, (b)). Im Unterschied zu rekombinantem und natürlichem Proguanylin (Kapitel 5.1.4.5) wurde die Probe in einer 1 mm Küvette mit der maximalen Rate auf 90 °C aufgeheizt und anschließend ebenso schnell wieder auf 20 °C abgekühlt.

Die CD-Spektren von Proguanylin- $\Delta(28-37)$ waren vor dem Aufheizen und nach dem Abkühlen deckungsgleich (Abb. 5.35, (b), durchgezogene und gestrichelte Linien), so daß die thermische Denaturierung aufgrund der schnellen Aufheiz- und Abkühlraten im Gegensatz zu den wildtypischen Proteinen vollständig reversibel war (vgl. Kapitel 5.1.4.5). Das bei 90 °C erhaltene Spektrum spricht für eine deutliche Abnahme der regulären Sekundärstruktur und entspricht dem des Wildtyp-Proteins (Abb. 5.35, (b) und 5.10, (c, d)).

5.2.3.3 NMR-spektroskopische Untersuchungen

Um die Auswirkungen der Deletion der Aminosäuren Arg28 bis Pro37 auf die dreidimensionale Struktur von Proguanylin untersuchen zu können, wurde Proguanylin- $\Delta(28-37)$ ^{15}N markiert (Kapitel 5.1.3.5 und 5.3.2) und die ^1H , ^{15}N -HSQC Spektren von Proguanylin und Proguanylin- $\Delta(28-37)$ verglichen (Abb. 5.36).

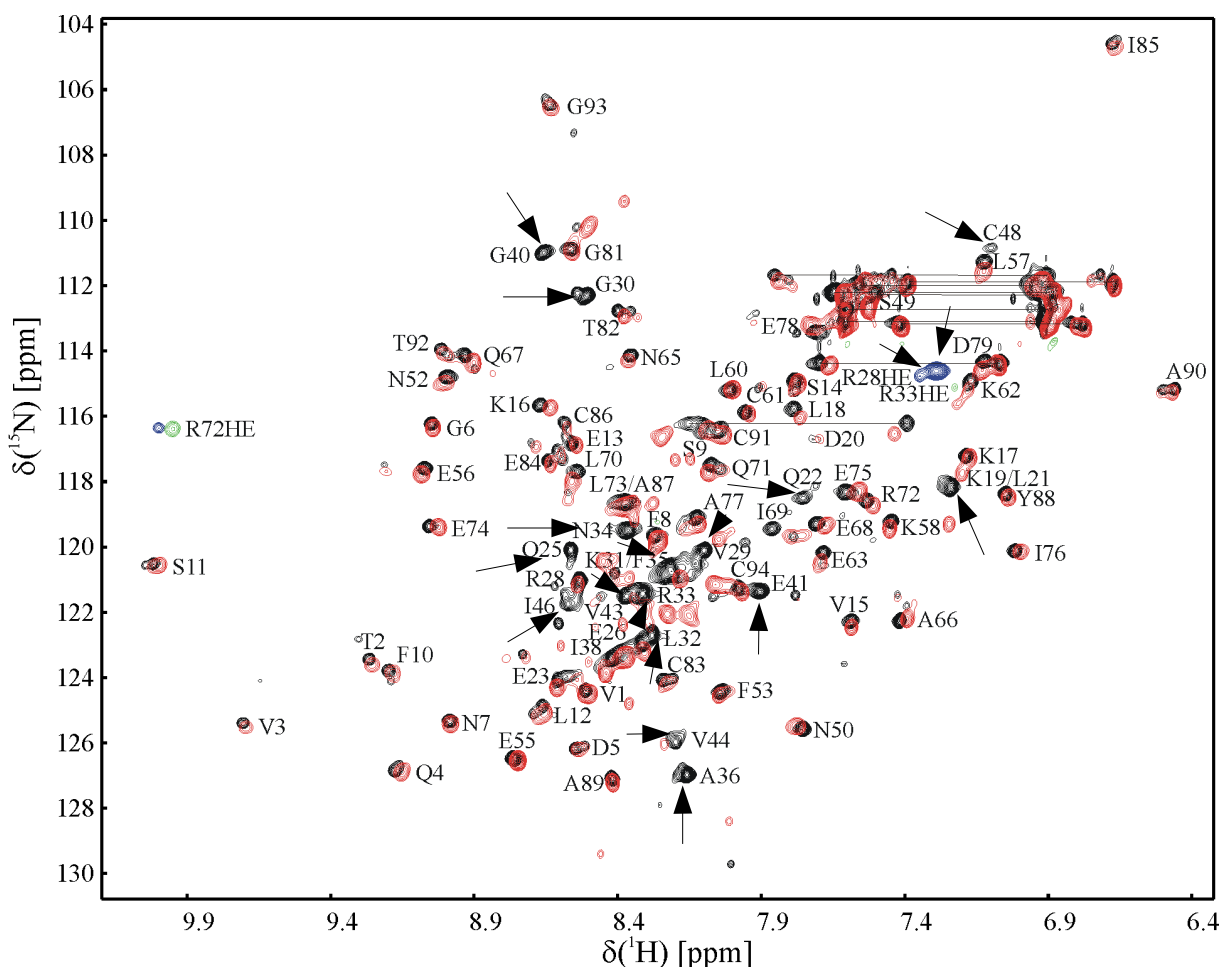


Abbildung 5.36: ^1H , ^{15}N -HSQC Spektren von ^{15}N Proguanylin (schwarz/blau) und ^{15}N Proguanylin- $\Delta(28-37)$ (rot/grün). Die Zuordnung der Resonanzen ist für ^{15}N Proguanylin angegeben. Resonanzen des Wildtyp-Proteins, die bei ^{15}N Proguanylin- $\Delta(28-37)$ nicht beobachtet wurden, sind durch Pfeile markiert. Gefaltete ϵ -Resonanzen der Argininseitenketten sind blau bzw. grün dargestellt, die Resonanzen der NH_2 -Seitenketten von Asparagin und Glutamin (Wildtyp) sind jeweils durch eine Linie verbunden. Meßbedingungen: ^{15}N Proguanylin (1,1 mM) und ^{15}N Proguanylin- $\Delta(28-37)$ (500 μM) in 50 mM Kalium-Phosphat (10 % D_2O , v/v), pH 6,0; die ppm-Werte sind auf DSS als externen Standard bezogen bzw. indirekt über das Frequenzverhältnis ($\omega_{\text{N}}/\omega_{\text{H}} = 0.101329118$; Markley *et al.* 1998) geeicht.

Für den Großteil der im ^1H , ^{15}N -HSQC Spektrum von Proguanylin beobachteten Signale können entsprechende Resonanzen im Spektrum von Proguanylin- $\Delta(28-37)$ identifiziert

werden (Abb. 5.36). Unterschiede in den Spektren beschränken sich auf Resonanzen, die den deletierten Aminosäuren und den der mutierten Region benachbarten Resten entsprechen (Abb. 5.36, durch Pfeile markiert; Abb. 5.37, (a), orange und türkis gefärbt). Die gute Übereinstimmung der Amidresonanzen von Cystein 83, 86, 91 und 94 bestätigt außerdem die Ausbildung der korrekten Disulfidverbrückung für Proguanylin- $\Delta(28-37)$ (Abb. 5.36).

Die Kartierung aller beobachteten Veränderungen auf der Struktur von Proguanylin zeigt, daß die gut definierten Bereiche der Struktur, wie z.B. Elemente mit regulärer Sekundärstruktur oder an der Ausbildung des hydrophoben Kerns beteiligte Aminosäuren nicht durch die Mutation beeinflusst werden (Abb. 5.37). Für die übrige, wenig definierte Region der Proguanylin-Struktur sollte man jedoch eine strukturelle Reorientierung erwarten, da eine direkte Verbindung von Pro27 mit Ile38 zu einer ungünstigen räumlichen Nähe von Helix 1 und den dem deletierten Bereich benachbarten Resten führen würde (Abb. 5.37, (b), roter Pfeil). Die in den ^1H , ^{15}N -HSQC Spektren beobachteten Unterschiede (Abb. 5.36) deuten daher eine Umstrukturierung der gesamten Region von Leu21 bis Cys48 an (Abb. 5.37).

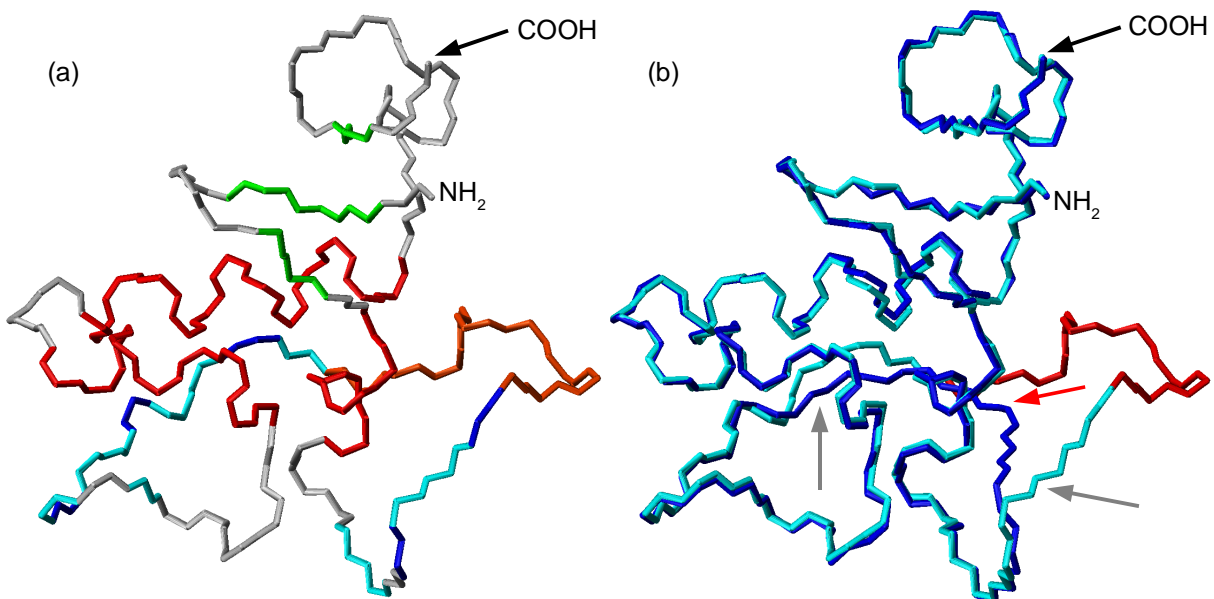


Abbildung 5.37: Schematische Darstellung des Rückgratverlaufs der Proguanylin-Struktur. (a) Aminosäuren, deren Amidresonanzen im ^1H , ^{15}N -HSQC Spektrum von Proguanylin- $\Delta(28-37)$ nicht detektiert wurden, bzw. für die eine Veränderung der chemischen Verschiebung beobachtet wurde, sind farblich hervorgehoben. Orange: deletiert; türkis: von der Deletion beeinflusst; blau: Proline. Helikale Elemente sind in rot, Faltblattstränge sind in grün dargestellt. (b) Deletion der Reste 28-37 (roter Bereich) und eine anschließende Energieminimierung (SYBYL, Tripos Inc.) zeigen, daß es in den die Mutation flankierenden Bereichen zu einer deutlichen Umstrukturierung kommt (graue Pfeile). Ungünstige räumliche Kontakte (roter Pfeil) machen jedoch weitere geringfügige strukturelle Änderungen notwendig, die in Einklang mit den Beobachtungen in den Spektren sind ((a) und Abb. 5.36). Türkis: Proguanylin-Struktur; blau: nach Deletion energieminierte Struktur.

5.2.4 Proguanylin-C48S/C61S

Um die Bedeutung der Disulfidbrücke zwischen Cys48 und Cys61 für die dreidimensionale Struktur von Proguanylin und eine mögliche Funktion bei der Ausbildung der nativen Disulfidbrücken der Hormonregion (d.h. Cys83 – Cys91 und Cys86 – Cys94) zu untersuchen, wurden die Cysteinreste 48 und 61 jeweils durch Serin substituiert.

5.2.4.1 Spektroskopische Untersuchungen

Um den Einfluß der Disulfidbrücke zwischen Cys48 und Cys61 auf die Struktur von Proguanylin besser analysieren zu können, wurden CD- und NMR Spektren von Proguanylin-C48S/C61S aufgenommen.

CD-Spektroskopie

Im Vergleich mit dem Fern-UV-CD-Spektrum von Proguanylin (Wildtyp) zeichnet sich das Spektrum von Proguanylin-C48S/C61S durch eine deutliche Verschiebung des Nulldurchgangs und des absoluten Minimums zu kleineren Wellenlängen bei gleichzeitiger Abnahme der Signalintensität des gesamten Spektrums aus (Abb. 5.38, (a)). Damit ist das CD-Spektrum von Proguanylin-C48S/C61S für ein unstrukturiertes Protein charakteristisch, für das ein absolutes Minimum bei etwa 190 nm und das Fehlen eines Nulldurchgangs typisch ist (Greenfield & Fasman, 1969).

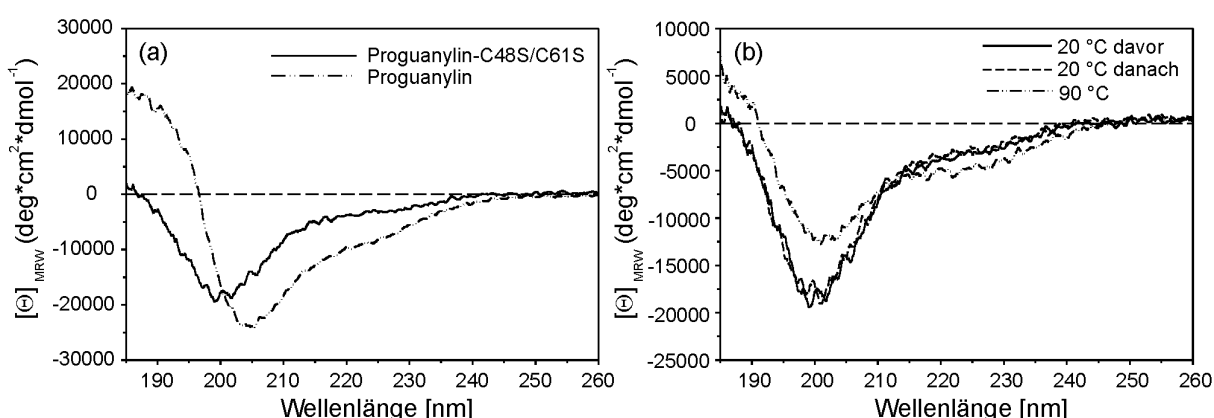


Abbildung 5.38: Fern-UV-CD-Spektren von rekombinantem Proguanylin-C48S/C61S. (a) Vergleich der Spektren von Proguanylin-C48S/C61S und Wildtyp-Proguanylin. (b) Für die Aufnahme von CD-Spektren bei verschiedenen Temperaturen wurde die Probe mit der maximalen Rate aufgeheizt bzw. wieder abgekühlt. Meßbedingungen: 6,2 μM Proguanylin-C48S/C61S in 10 mM Kalium-Phoshat, pH 6,0. Schichtdicke der Küvette: 1 mm. Davor: vor dem Aufheizen; danach: nach dem Abkühlen.

Der Einfluß der Temperatur auf die Struktur von Proguanylin-C48S/C16S wurde durch Aufnahme von Spektren vor dem Aufheizen (20 °C) bzw. direkt nach dem Abkühlen (20 °C) der Probe und bei 90 °C untersucht (Abb. 5.38, (b)). Wie schon bei Proguanylin-Δ(28-37) (Kapitel 5.2.1.4) wurde die Probe in einer 1 mm Küvette mit der maximalen Rate auf 90 °C aufgeheizt und anschließend wieder auf 20 °C abgekühlt, so daß die thermische Denaturierung im Gegensatz zu den wildtypischen Proteinen (vgl. Kapitel 5.1.4.5) vollständig reversibel war (Abb. 5.38, (b), vgl. davor und danach).

Bei insgesamt etwas geringerer Intensität zeigt das bei 90 °C erhaltene Spektrum von Proguanylin-C48S/C61S (Abb. 5.38, (b)) einen mit den 90 °C Spektren der bisher vorgestellten Proguanylin-Varianten übereinstimmenden Verlauf (Kapitel 5.1.4.5, 5.2.1.4). Gegenüber den Spektren bei 20 °C (vor dem Aufheizen, bzw. nach dem Abkühlen) ist der Nulldurchgang jedoch zu größeren Wellenlängen (etwa 190 nm) verschoben. Diese Veränderung wird von einer Verschiebung der mittleren molaren Elliptizität pro Aminosäurerest zu positiveren Werten zwischen 185 nm und 215 nm sowie zu negativeren Werten zwischen 215 nm und 245 nm begleitet (diskutiert in Kapitel 6.1.2.1).

NMR-spektroskopische Untersuchungen

Um neben dem in den CD-Spektren beobachteten Einfluß der Disulfidbrücke Cys48 – Cys61 auf die reguläre Sekundärstruktur auch deren Einfluß auf die Faltung des gesamten Prohormons zu untersuchen, wurde ein ^1H , ^{15}N -HSQC Spektrum von ^{15}N Proguanylin-C48S/C61S aufgenommen und mit dem Spektrum von ^{15}N Proguanylin verglichen (Abb. 5.39).

Das ^1H , ^{15}N -HSQC Spektrum von Proguanylin-C48S/C61S (Abb. 5.39) zeigt eine Dispersion der Amidprotonenresonanzen von nur 1,7 ppm und eine daraus resultierende Überlagerung von Resonanzen, so daß nicht für jedes Amidproton ein separiertes Signal beobachtet werden kann. Dieser Dispersionsverlust gegenüber dem Wildtyp-Protein, für das eine Dispersion von etwa 3,5 ppm beobachtet wird, ist gleichbedeutend mit einem Verlust der definierten dreidimensionalen Struktur von Proguanylin-C48S/C61S und bestätigt die aus den CD-Spektren erhaltenen Hinweise. Die Disulfidbrücke zwischen Cys48 und Cys61 scheint demnach eine stabilisierende Funktion auf die dreidimensionale Struktur von Proguanylin zu besitzen.

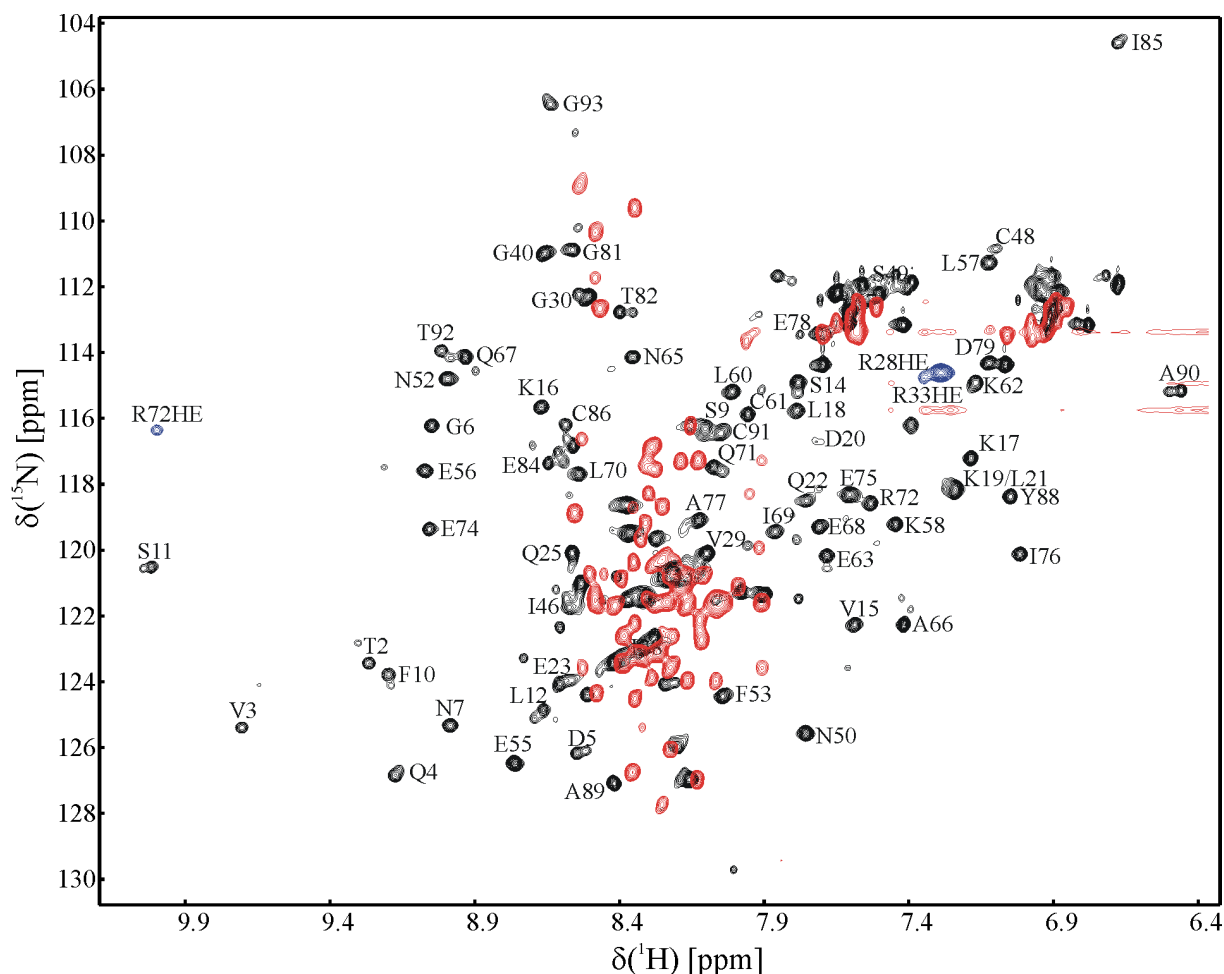


Abbildung 5.39: ^1H , ^{15}N -HSQC Spektren von ^{15}N Proguanylin (schwarz/blau) und ^{15}N Proguanylin-C48S/C61S (rot). Zur Orientierung ist ein Großteil der Zuordnung der Resonanzen für ^{15}N Proguanylin angegeben. Gefaltete ϵ -Resonanzen der Argininseitenketten sind blau dargestellt, die Resonanzen der NH_2 -Seitenketten von Asparagin und Glutamin sind nicht gekennzeichnet. Meßbedingungen: ^{15}N Proguanylin (1,1 mM) und ^{15}N Proguanylin-C48S/C61S (400 μM) in 50 mM Kalium-Phosphat (10 % D_2O , v/v), pH 6,0; die ppm-Werte sind auf DSS als externen Standard bezogen bzw. indirekt über das Frequenzverhältnis ($\omega_{\text{N}}/\omega_{\text{H}} = 0.101329118$; Markley *et al.*, 1998) geeicht.

5.2.4.2 Analyse der Disulfidverbrückung

Um zu prüfen, ob es bei Proguanylin-C48S/C61S trotz der fehlenden definierten dreidimensionalen Struktur zur Ausbildung der nativen Disulfidbrücken kommt, wurde das Disulfidverbrückungsmuster dieser Mutante, wie bereits für wildtypisches Proguanylin beschrieben, durch analytische RP-HPLC untersucht (Kapitel 5.1.4.3 und 4.14). Neben dem charakteristischen Doppelpeak für biologisch aktives Guanylin mit einer 1-3/2-4 Disulfidverbrückung können nach Essigsäure-Spaltung von rekombinantem Proguanylin-C48S/C61S zwei weitere Guanylin-Peaks im Chromatogramm identifiziert werden (Abb. 5.40, (b)).

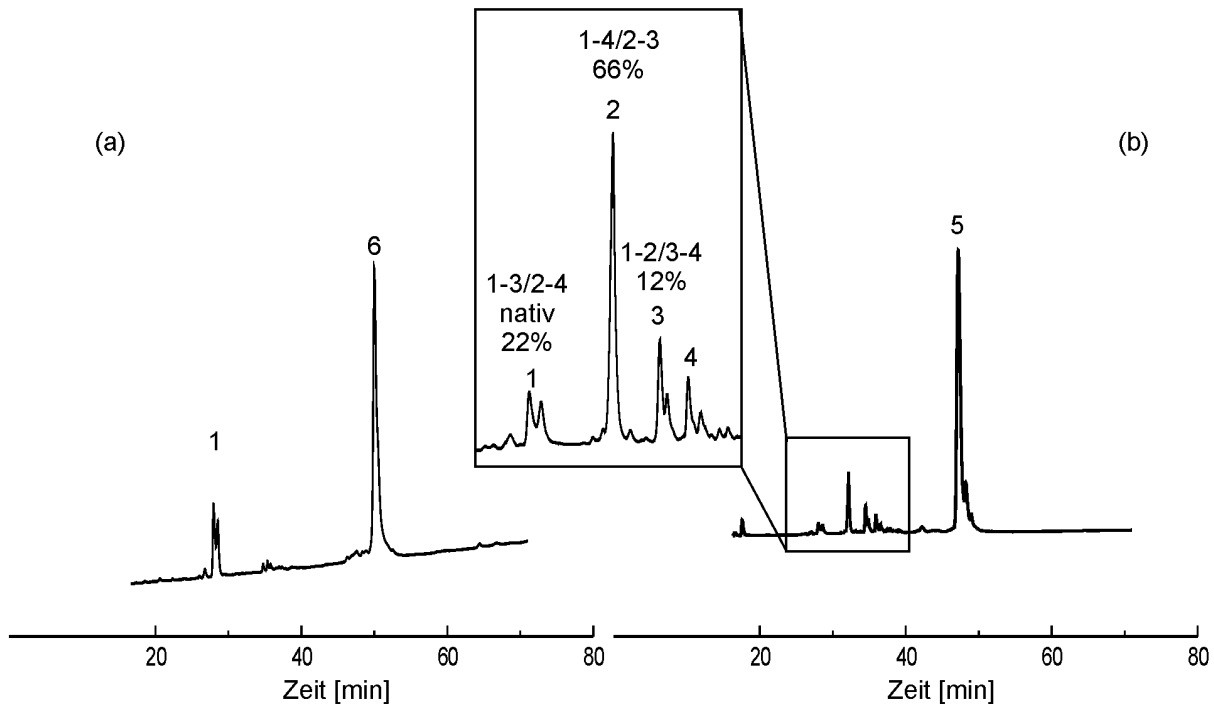


Abbildung 5.40: RP-HPLC-Untersuchungen nach Essigsäure-Spaltung (Kapitel 4.14) von natürlichem Proguanylin (a) und rekombinantem Proguanylin-C48S/C61S (b). (Doppel)peak 1: Guanylin mit nativer 1-3/2-4 Verbrückung; Peak 2: Guanylin mit 1-4/2-3 Verbrückung; Peak 3: Guanylin mit 1-2/3-4 Verbrückung; Peak 4: Fragment 1-20 (GPVTVQDGNFSFSLESVKLLKD; M: 2395 Da); Peak 5: Prosequenz von rekombinantem Proguanylin-C48S/C61S (M: 9020 Da); Peak 6: Prosequenz von natürlichem Proguanylin (M: 8896 Da). Die übereinstimmenden Massen der Guanylin-Peaks (1 bis 3) wurden durch ESI-Massenspektrometrie nachgewiesen (M: 1458 Da).

Durch den Vergleich mit reoxidiertem synthetischem Guanylin (Schulz *et al.*, 1999) können die Peaks den beiden biologisch inaktiven Disulfidisomeren mit einer 1-4/2-3 (Abb. 5.40, (b); Peak 2) und einer 1-2/3-4 (Peak 3) Verbrückung zugeordnet werden. Die relativen Anteile der jeweiligen Isomere sind: 22 % 1-3/2-4 (nativ), 66 % 1-4/2-3 (inaktiv) und 12 % 1-2/3-4 (inaktiv). Für die Prosequenz wurde das bereits beschriebene Elutionsverhalten beobachtet (Kapitel 4.1.4.3).

Die deletierte Disulfidbrücke Cys48 – Cys61 hat demnach einen deutlichen Einfluß auf die Stabilisierung der definierten Struktur von Proguanylin und die Ausbildung der korrekten Disulfidverbrückung in der Hormonregion.

5.2.5 Proguanylin-C86S/C94S

Um den Einfluß der Faltung der Prosequenz auf die Stabilisierung der Struktur der Hormonregion von Proguanylin zu untersuchen, wurde eine der beiden für die Aktivität von Guanylin essentiellen Disulfidbrücken deletiert. Da das an der Ausbildung der β -Faltblattstruktur beteiligte Cys91 durch die Mutation nicht beeinflußt werden sollte, wurden die Cysteinreste 86 und 94 jeweils durch Serin substituiert. Der gesamte Hormonbereich sollte daher eine vergleichsweise höhere konformationelle Freiheit erhalten und dadurch möglicherweise die Wechselwirkungen zwischen den Termini beeinflussen. Die durch die Deletion der genannten Disulfidbrücke verursachten Veränderungen in der Proguanylin-Struktur wurden durch die Aufnahme von CD- und NMR Spektren von Proguanylin-C86S/C94S analysiert.

5.2.5.1 CD-Spektroskopie

Bei einem Vergleich der Fern-UV-CD-Spektren von Proguanylin und Proguanylin-C86S/C94S fallen neben einem nahezu identischen Verlauf einige Unterschiede auf (Abb. 5.41, (a)). So kann für Proguanylin-C86S/C94S eine geringe Verschiebung des Nulldurchgangs zu kleineren Wellenlängen und eine Abnahme der mittleren molaren Elliptizität von 185 nm und 197 nm und eine geringe Zunahme zwischen 208 nm und 215 nm beobachtet werden. Insbesondere die Intensitätsabnahme bei kleinen Wellenlängen und die Verschiebung des Nulldurchgangs sind Hinweise für einen erhöhten Anteil unstrukturierter Bereiche bei Proguanylin-C86S/C94S (Greenfield & Fasman, 1969).

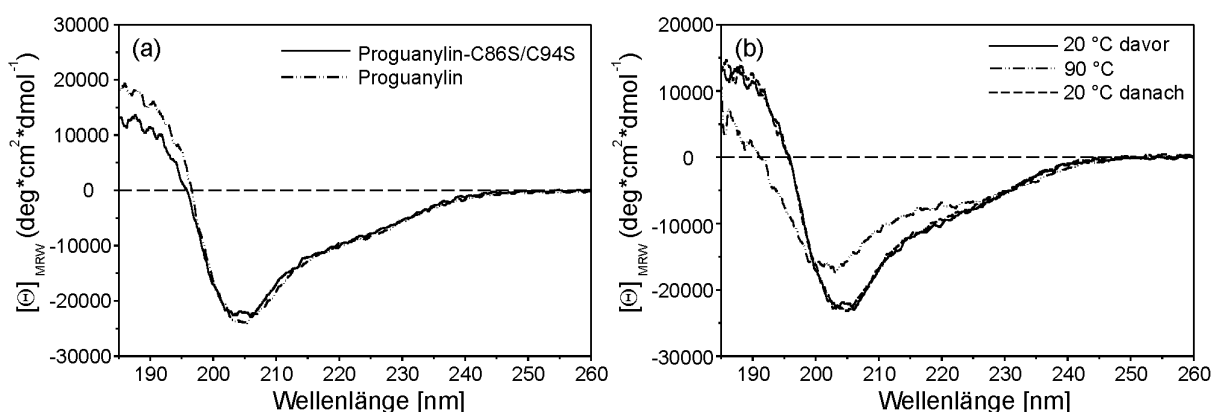


Abbildung 5.41: Fern-UV-CD-Spektren von rekombinantem Proguanylin-C86S/C94S. (a) Vergleich der Spektren von Proguanylin-C86S/C94S und Wildtyp-Proguanylin. (b) Für die Aufnahme von CD-Spektren bei verschiedenen Temperaturen wurde die Probe mit der maximalen Rate aufgeheizt, bzw. wieder abgekühlt. Meßbedingungen: 8,6 μ M Proguanylin-C86S/C94S in 10 mM Kalium-Phosphat, pH 6,0. Schichtdicke der Küvette: 1 mm. Davor: vor dem Aufheizen; danach: nach dem Abkühlen.

Die schnellen Aufheiz- bzw. Abkühlraten ermöglichten, wie bei den bisher vorgestellten Proguanylin-Mutanten (Kapitel 5.2.3 und 5.2.4), eine vollständige Reversibilität der thermischen Denaturierung von Proguanylin-C86S/C94S (Abb. 5.41, (b), durchgezogene und gestrichelte Linien). Bei 90 °C ist ebenfalls eine deutliche Abnahme der regulären Sekundärstruktur zu verzeichnen, und das erhaltene Spektrum weist einen mit den 90 °C Spektren der übrigen Proguanylin-Varianten – einschließlich des Wildtyp-Proteins – übereinstimmenden Verlauf auf (Abb. 5.10, (c, d), 5.35, (b), 5.38, (b) und 5.41, (b)).

5.2.5.2 NMR-spektroskopische Untersuchungen an Proguanylin-C86S/C94S

Für eine bessere Charakterisierung der durch den Vergleich der CD-Spektren von Proguanylin und Proguanylin-C86S/C94S aufgefallenen Veränderungen der Sekundärstruktur wurde nach ^{15}N Markierung (Kapitel 5.1.3.5) ein ^1H , ^{15}N -HSQC Spektrum des mutierten Proteins aufgenommen (Abb. 5.42).

Die Dispersion der Amidprotonenresonanzen im ^1H , ^{15}N -HSQC Spektrum von Proguanylin-C86S/C94S ist mit ungefähr 2,6 ppm (Abb. 5.42) etwas schlechter als die des Wildtyp-Proteins (Abb. 5.43, 5.18). Weitere Auffälligkeiten des Spektrums sind deutlich breitere und teilweise unregelmäßige Linienformen sowie eine stärkere Überlagerung von Resonanzen, die auf eine schwächer ausgeprägte Tertiärstruktur und eine veränderte Dynamik des Proteins hinweisen.

Zuordnung der Resonanzen

Da ein einfacher Vergleich der Spektren von Proguanylin-C86S/C94S und Proguanylin keine Zuordnung der Resonanzen erlaubte, wurden die folgenden Spektren für die Zuordnung von ^{15}N Proguanylin-C86S/C94S aufgenommen: ^{15}N -NOESY-HSQC, ^{15}N -TOCSY-HSQC und HNHA.

In den ^1H , ^{15}N -HSQC Spektren von Wildtyp-Protein und Mutante übereinstimmende Resonanzen (Abb. 5.43, (a)) dienten als Hinweise auf spezifische Spinsysteme und konnten als Startpunkte für die sequenzspezifische Zuordnung von Proguanylin-C86S/C94S verwendet werden. Die weitere Zuordnung erfolgte nach der Methode des sogenannten *chaintracing* (Wüthrich, 1986; vgl. Abb. 5.19) anhand der charakteristischen NOE-Kreuzsignale des ^{15}N -NOESY-HSQC Spektrums. Aufgrund der bereits beschriebenen Häufung und Überlagerung von Resonanzen im ^1H , ^{15}N -HSQC Spektrum konnten auf diese

Weise 71 der 83 Amidresonanzen eindeutig zugeordnet werden (Abb. 5.42). Außerdem ermöglichten eindeutige NOE-Kreuzresonanzen die Zuordnung der $^1\text{H}\alpha$ Spins von sechs der elf Prolinresten. Da die chemische Verschiebung der $^1\text{H}\alpha$ Resonanzen bereits Information über die sequenzspezifische Sekundärstruktur liefert (Kapitel 4.19.8), wurde auf eine vollständige Zuordnung der Seitenkettenamide von Glutamin und Asparagin verzichtet. Die getroffene Zuordnung ist in Abbildung 5.42 und im Anhang (Kapitel 10.4) wiedergegeben.

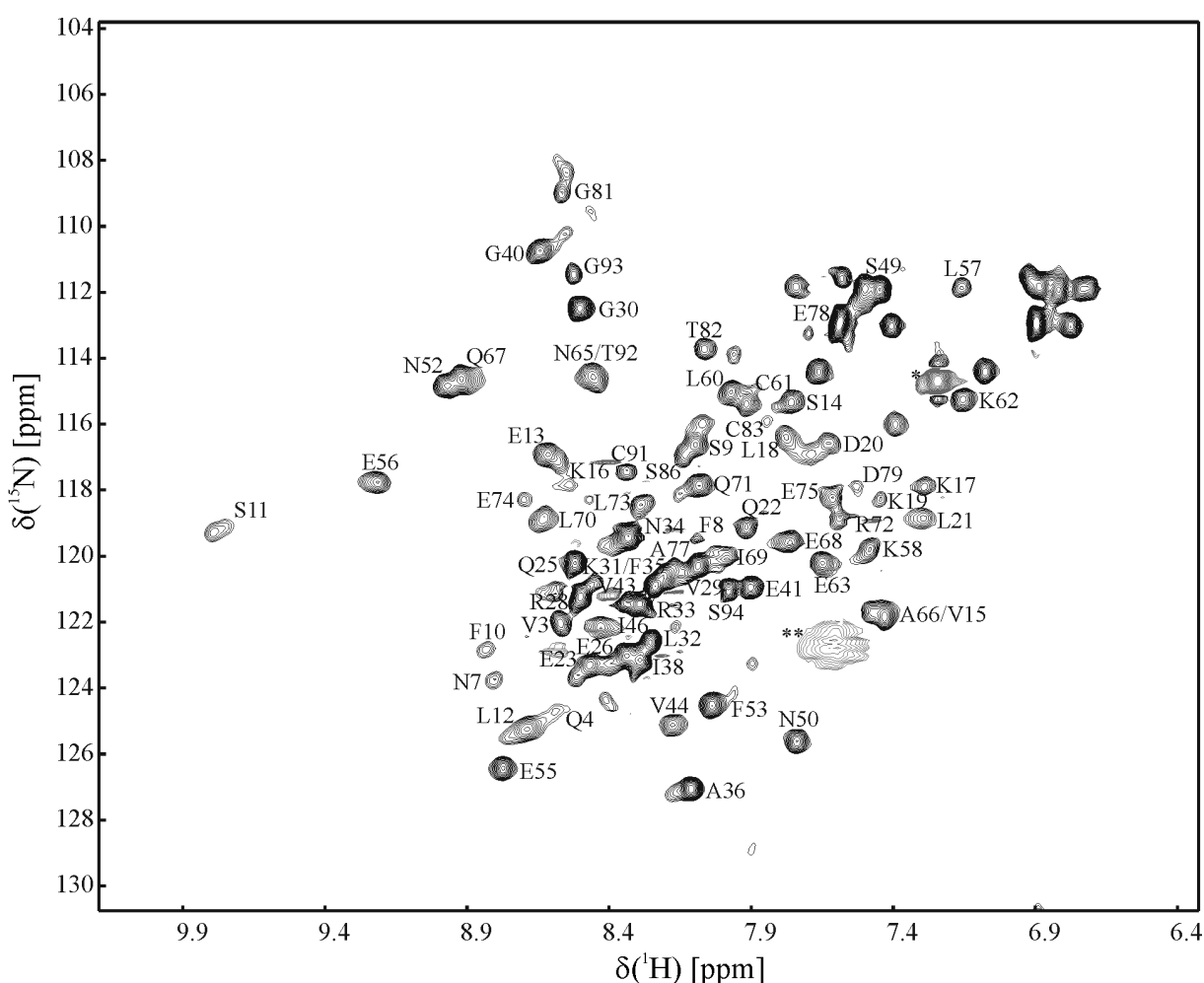


Abbildung 5.42: ^1H , ^{15}N -HSQC Spektrum von ^{15}N Proguanylin-C86S/C94S. Die Zuordnung der Resonanzen ist angegeben. Gefaltete ϵ -Resonanzen der Argininseitenketten sind mit *, die ζ -Resonanzen der Lysinseitenketten sind mit ** gekennzeichnet. Die Resonanzen der NH_2 -Seitenketten von Asparagin und Glutamin wurden nicht zugeordnet und sind nicht markiert. Meßbedingungen: ^{15}N Proguanylin-C86S/C94S (1 mM) in 50 mM Kalium-Phosphat (10 % D_2O , v/v), pH 6,0; die ppm-Werte sind auf DSS als externen Standard bezogen bzw. indirekt über das Frequenzverhältnis ($\omega_{\text{N}}/\omega_{\text{H}} = 0.101329118$; Markley *et al.*, 1998) geeicht.

Vergleich von Proguanylin und Proguanylin-C86S/C94S

Nach erfolgter Zuordnung der Amidprotonenresonanzen von Proguanylin-C86S/C94S wurden die durch die Mutation verursachten Veränderungen im ^1H , ^{15}N -HSQC Spektrum genauer analysiert. Ein direkter Vergleich der Spektren von Wildtyp-Protein und Mutante (Abb. 5.43, (a)) zeigt, daß durch die Mutation hauptsächlich isolierte Signale mit sehr ausgeprägter chemischer Verschiebung betroffen sind. Die sequenzspezifische Kartierung aller auffälligen Veränderungen der Amidprotonenresonanzen (Abb. 5.43, (b)) beschränkt den Einfluß der Deletion der Disulfidbrücke Cys86 – Cys94 auf den gesamten Hormonbereich, den COOH-terminalen Bereich von Helix 3 und die β -Faltblattstruktur. An der Ausbildung des hydrophoben Kerns beteiligte Aminosäuren, insbesondere Val15, Leu18, Phe53, Leu57, Leu60 und Leu73, und somit die helikalen Bereiche, sind von der Mutation praktisch nicht betroffen. Das gleiche gilt für den unstrukturierten Bereich von Gln22 bis Ile46.

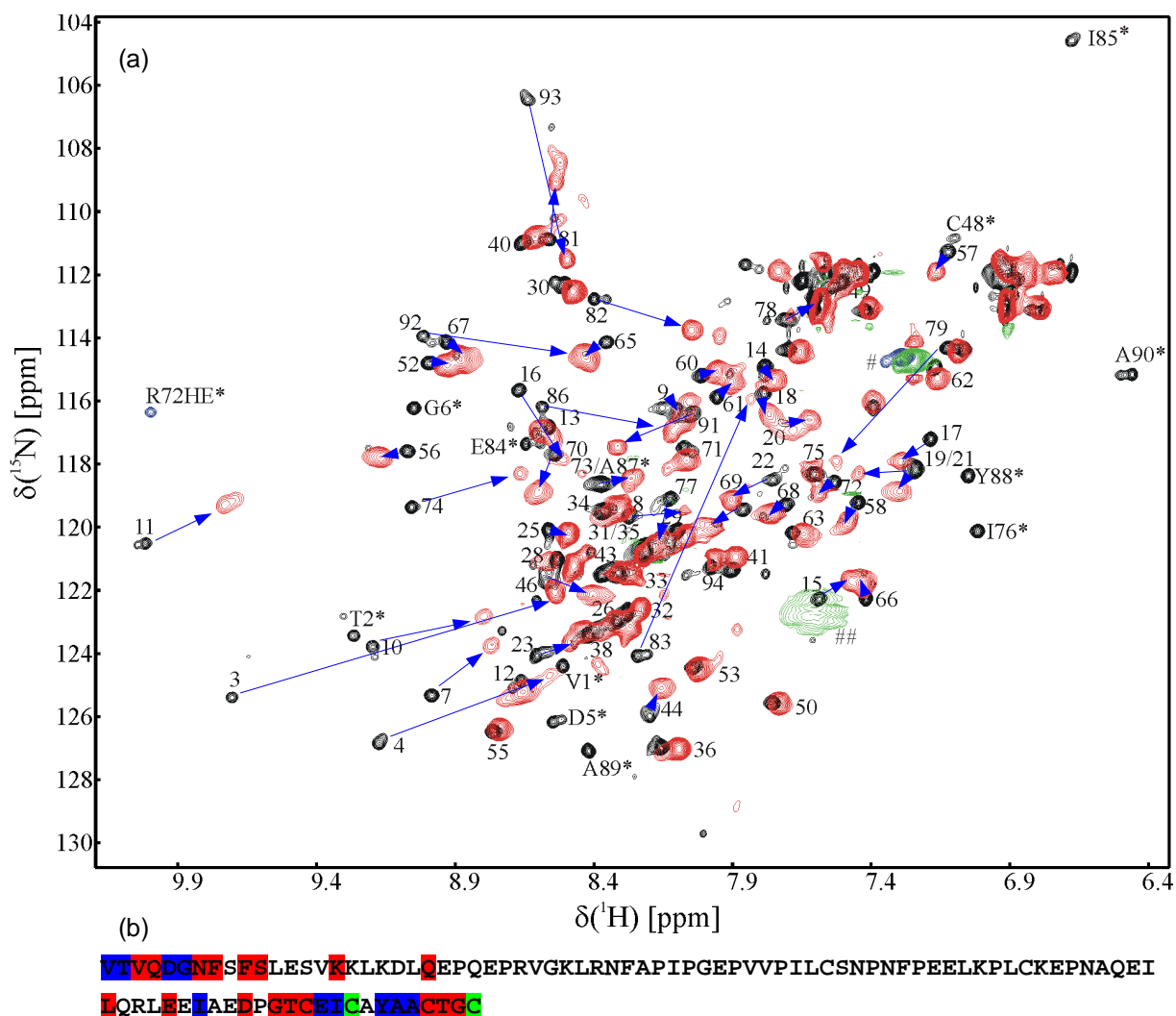


Abbildung 5.43: (a) ^1H , ^{15}N -HSQC Spektren von ^{15}N Proguanylin (schwarz/blau) und ^{15}N Proguanylin-C86S/C94S (rot/grün). Die Zuordnung der Resonanzen für Proguanylin (Wildtyp) ist angegeben, die entsprechenden Positionen der Signale für die Mutante sind durch hellblaue Pfeile markiert. Aminosäuren, die bei Proguanylin-C86S/C94S nicht zugeordnet werden konnten, sind mit dem jeweiligen Typ und * gekennzeichnet. Gefaltete ϵ -Resonanzen der Argininseitenketten sind blau bzw. grün dargestellt, die Resonanzen der NH_2 -Seitenketten von Asparagin und Glutamin sind nicht gekennzeichnet. Proguanylin-C86S/C94S: #, gefaltete ϵ -Resonanzen der Argininseitenketten; ##, ζ -Resonanzen der Lysinseitenketten. Meßbedingungen: ^{15}N Proguanylin (1,1 mM) und ^{15}N Proguanylin-C86S/C94S (1 mM) in 50 mM Kalium-Phosphat (10 % D_2O , v/v), pH 6,0; die ppm-Werte sind auf DSS als externen Standard bezogen bzw. indirekt über das Frequenzverhältnis ($\omega_{\text{N}}/\omega_{\text{H}} = 0.101329118$; Markley *et al.*, 1998) geeicht. (b) Kartierung der beobachteten Änderungen der Amidprotonenresonanzen auf der Sequenz von Proguanylin. Rot: Änderungen $> 0,15$ ppm (^1H), bzw. > 1 ppm (^{15}N); blau: große Änderung beobachtet, jedoch bei Proguanylin-C86S/C94S nicht zugeordnet; grün: mutierte Position.

Um eine mögliche Korrelation zwischen den in den Spektren beobachteten Veränderungen und einem Verlust der in den betroffenen Bereichen vorliegenden Sekundärstruktur zu überprüfen, wurden die sekundären chemischen Verschiebungen der $^1\text{H}\alpha$ Spins von Proguanylin und Proguanylin-C86S/C94S miteinander verglichen (Abb. 5.44).

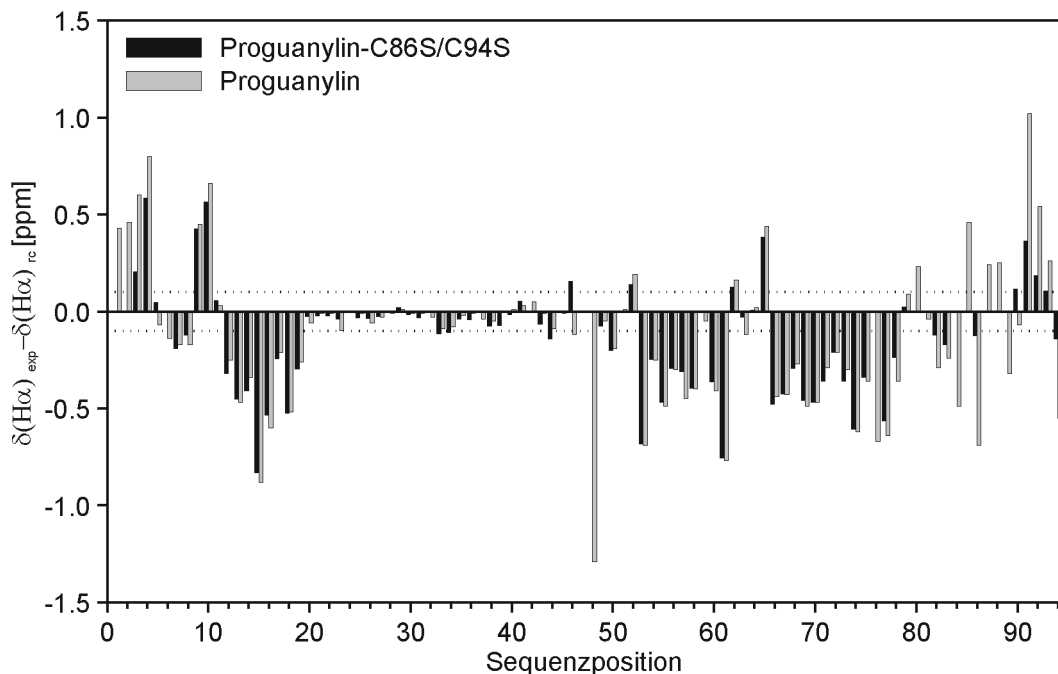


Abbildung 5.44: Vergleich der sekundären $^1\text{H}\alpha$ Verschiebungen von Proguanylin und Proguanylin-C86S/C94S. Aufgetragen sind die Differenzen zwischen experimentellen $^1\text{H}\alpha$ Verschiebungen ($\delta(\text{H}\alpha)_{\text{exp}}$) und den entsprechenden Werten aus unstrukturierten Peptiden ($\delta(\text{H}\alpha)_{\text{rc}}$; Wishart *et al.*, 1995). Die Schwellenwerte von $\pm 0,1$ ppm für die Zuordnung eines Verschiebungsindex von ± 1 sind durch gestrichelte Linien gekennzeichnet.

Die sekundären chemischen Verschiebungen von Proguanylin-C86S/C94S zeigen über den größten Teil der Sequenz eine sehr gute Übereinstimmung mit denen des Wildtyp-Proteins (Abb. 5.44). Insbesondere in den Bereichen der drei α -Helices und in der unstrukturierten Region (Gln22 bis Val44) können praktisch keine Differenzen zwischen den Verschiebungen der beiden Proteine festgestellt werden. Die sekundären chemischen Verschiebungen bestätigen somit die Beobachtungen aus den ^1H , ^{15}N -HSQC Spektren, in denen für den Sequenzabschnitt von Leu12 bis Glu78 nur relativ geringe Veränderungen der NH-Resonanzen beobachtet wurden (Abb. 5.43). Einige charakteristische weitreichende NOE-Kontakte, wie z.B. zwischen Leu70 und Leu60, sowie die extreme Hochfeldverschiebung der Methylresonanzen von Leu57 (vgl. Kapitel 5.1.5.7 und Abb. 5.11) bestätigen außerdem die Ausbildung des hydrophoben Kerns und aller Helices.

Auffällige Abweichungen der sekundären $^1\text{H}\alpha$ Verschiebungen beschränken sich vor allem auf die Aminosäuren des ersten und dritten Faltblattstrangs (Abb. 5.44). Trotz der signifikanten Abnahme der sekundären chemischen Verschiebungen für Val3, Gln4, Cys91, Thr92 und Gly93 kann diesen Aminosäuren mit Ausnahme von Gly93 weiterhin ein Verschiebungsindex von +1 zugeordnet werden. Proguanylin-C86S/C94S besitzt somit ebenfalls die Tendenz zur Ausbildung des dreisträngigen Faltblattes. Die für dieses Faltblatt charakteristischen weitreichenden NOE-Kontakte konnten jedoch nicht im ^{15}N -NOESY-HSQC Spektrum dieser Mutante identifiziert werden, so daß sich die Unterschiede zu dem ^1H , ^{15}N -HSQC Spektrum des Wildtyp-Proteins vermutlich vor allem auf den Verlust zahlreicher tertiärer Wechselwirkungen zwischen den terminalen Sequenzabschnitten zurückführen lassen.

5.3 Die extrazelluläre Domäne der Guanylatzyklase-C

Das Peptidhormon Guanylin ist unter anderem an der Regulation des Flüssigkeitshaushaltes im Darm beteiligt (Kapitel 1.4, 1.3.1). Diese physiologische Funktion wird durch die direkte Wechselwirkung mit der membrangebundenen Guanylatzyklase-C (GC-C) vermittelt (Kapitel 1.1, 1.4). Molekulare Details über die Wechselwirkung zwischen den physiologischen bzw. pathogenen Liganden und der extrazellulären Ligandenbindungsdomäne der GC-C (GC-C_{ECD}) sowie der genaue Mechanismus der Rezeptoraktivierung sind bislang jedoch völlig unbekannt.

Die GC-C_{ECD} stellt eine eigenständig gefaltete Einheit dar, die in löslicher Form exprimiert werden kann und eine mit der nativen, membrangebundenen Form vergleichbare Affinität zum hitzestabilen Enterotoxin STp aus *E. coli* besitzt ($K_D(\text{GC-C}) = 0,6 \text{ nM}$; $K_D(\text{GC-C}_{\text{ECD}}) = 0,4 \text{ nM}$; Hasegawa *et al.*, 1999a). Für strukturelle Untersuchungen mittels NMR Spektroskopie ist diese Domäne mit 410 Aminosäuren jedoch zu groß. Daher sollte ein für die NMR Spektroskopie zugängliches, lösliches und zur Ligandenbindung fähiges Rezeptorfragment entwickelt werden. Als ein mögliches derartiges Fragment schien ein von Hidaka *et al.* (2002) beschriebener 67 Aminosäuren umfassender Bereich der GC-C_{ECD} (Abb. 5.45, blauer Bereich) in Frage zu kommen. Für dieses als Mikrodomäne (*micro domain*) bezeichnete Fragment ($\mu\text{GC-C}$) war eine hochaffine Bindung des Liganden STp ($\text{IC}_{50} = 10 \text{ nM}$) nachgewiesen worden (Hidaka *et al.*, 2002). Daher wurde $\mu\text{GC-C}$ zunächst in *E. coli* wie beschrieben (Hidaka *et al.*, 2002) exprimiert und gereinigt (Ergebnisse nicht abgebildet; der Expressionsvektor wurde von Dr. Yuji Hidaka (Osaka, Japan) zur Verfügung gestellt). Gravierende Löslichkeitsprobleme erlaubten jedoch nur Konzentrationen kleiner 4 μM , so daß auf weitere Untersuchungen an diesem Fragment verzichtet wurde.

5.3.1 Komparative Molekülmodellierung der GC-C_{ECD}

Für die weitere Suche nach einem geeigneten Rezeptorfragment wurde ein Strukturmodell-basierender Ansatz gewählt, bei dem die Analyse einer Modellstruktur der gesamten extrazellulären Domäne der GC-C die Auswahl einer eigenständigen Faltungseinheit ermöglichen sollte.

Aus der Familie der membrangebundenen Guanylatzyklasen, der auch die GC-C angehört, wurde bislang nur die Struktur der extrazellulären Ligandenbindungsdomäne der Guanylatzyklase-A (GC-A oder ANPR) gelöst (van den Akker *et al.*, 2000). Mit der Kristallstruktur des *natriuretic peptide clearance* Rezeptors (NPR-C; He *et al.*, 2001) ist außerdem die Struktur einer homologen Domäne im Komplex mit einem Liganden bekannt. Dieser Rezeptor gehört jedoch nicht der Familie der Guanylatzyklasen an. Trotz der geringen Sequenzidentitäten zur GC-C_{ECD} von 19 % (GC-A) und 18 % (NPR-C), wird für die extrazelluläre Domäne der GC-C und die der übrigen Mitglieder der Familie der membrangebundenen Guanylatzyklasen eine mit der GC-A bzw. mit dem NPR-C übereinstimmende Faltung angenommen (van den Akker, 2001). Diese Annahme ist neben einem Sequenzvergleich auf einem Vergleich der experimentell bestimmten Sekundärstrukturen mit

den für die übrigen Rezeptoren vorhergesagten begründet.

Eine Sequenzanalyse mit 3D-PSSM (Kelley *et al.*, 2000), einem Programm zur sequenzbasierten Faltungsvorhersage von Proteinen, ergibt für die GC-C_{ECD} mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % eine GC-A- bzw. NPR-C-homologe Faltung. Basierend auf der obigen Annahme und dem Ergebnis der 3D-PSSM-Faltungsvorhersage wurde für den Bereich von Asn9 bis Pro406 mit den Programmen SWISS-PDBViewer und SWISS-MODEL (Guex & Peitsch, 1997) ein Strukturmodell der GC-C_{ECD} erstellt (Abb. 5.45). Die Kristallstruktur der extrazellulären Domäne der GC-A (PDB Eintrag 1dp4) diente dabei als Vorlage (Kapitel 4.21).

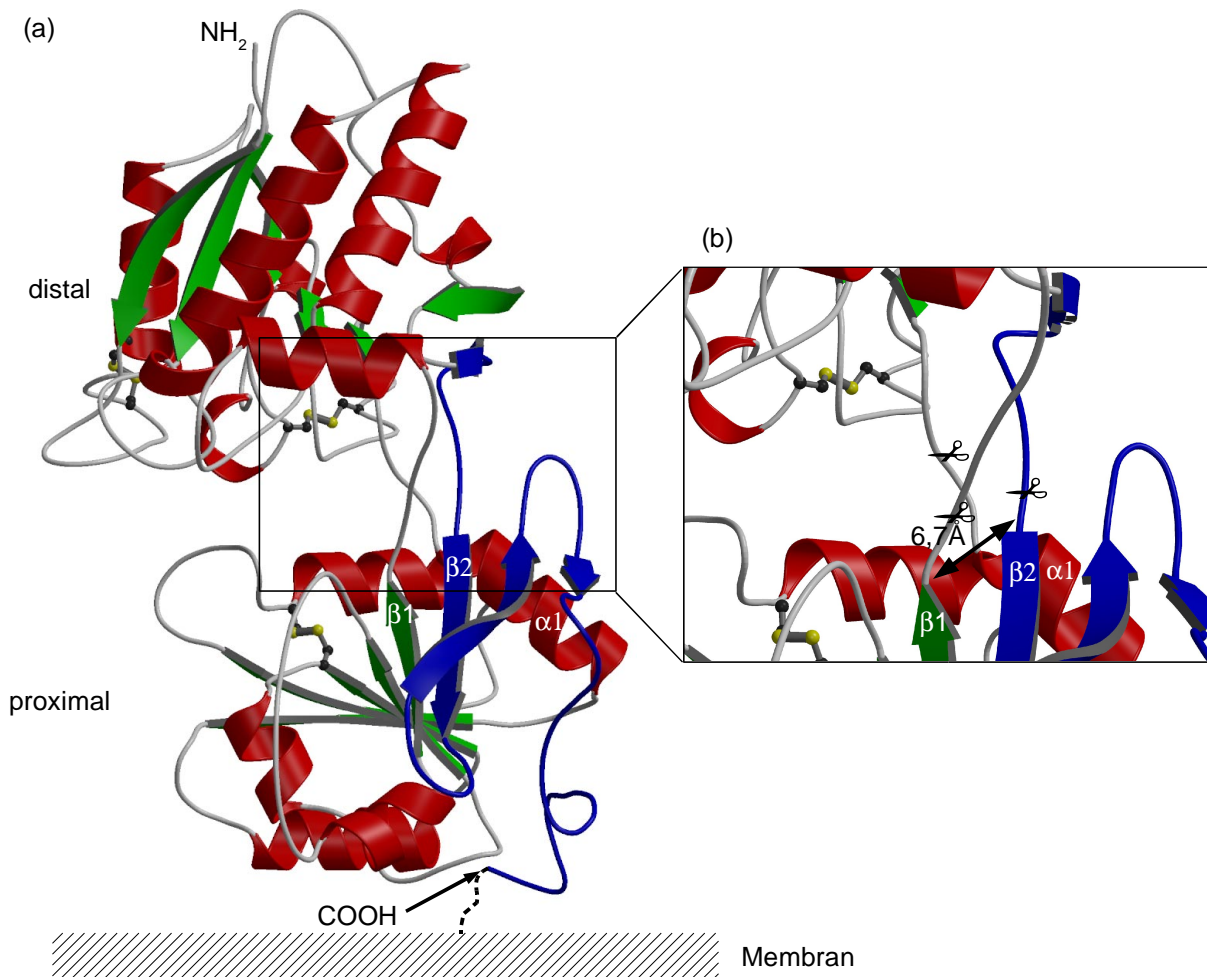


Abbildung 5.45: (a) Schematische Darstellung des Strukturmodells der extrazellulären Ligandenbindungsdomäne der GC-C. Der als μ GC-C bezeichnete Bereich (Hidaka *et al.*, 2002) ist in blau, Helices sind in rot und Faltblattstränge sind in grün dargestellt. Die experimentell bestimmten Disulfidbrücken (Dr. Yuji Hidaka, persönliche Mitteilung) sind als Stäbchenmodell dargestellt. (b) Ausschnitt aus der Verbindungsregion der beiden Subdomänen. Proximale und distale Subdomäne sind über drei Oligopeptide miteinander verbunden. Als scheinbar eigenständige, die Ligandenbindungsregion enthaltende Faltungseinheit sollte die proximale Subdomäne durch die ange deuteten Schnitte erhalten werden.

Die GC-C_{ECD} weist eine hohe strukturelle Homologie zu bakteriellen periplasmatischen Proteinen mit einer PBP-Faltung vom Typ I (*periplasmic binding protein fold, type I*; nach SCOP (*structural classification of proteins*), <http://scop.mrc-lmb.cam.ac.uk/scop/>) auf. Proteine dieses Faltungstyps bestehen aus zwei duplizierten Domänen, die jeweils aus einem von α -Helices flankierten, sechsträngigen parallelen β -Faltblatt aufgebaut sind. Ein weiteres Charakteristikum ist eine flexible, die beiden Domänen verbindende Region. Bei der GC-C_{ECD} werden die beiden Subdomänen entsprechend der Membrenumgebung benannt. Daher wird die membrannahe, COOH-terminale Domäne auch als proximale und die NH₂-terminale Domäne auch als distale Subdomäne bezeichnet (Abb. 5.45, (a)).

Die Sequenz der GC-C_{ECD} enthält neun Cysteinreste, von denen acht disulfidverbrückt sind. Der persönlichen Mitteilung von Dr. Yuji Hidaka (Osaka, Japan) zufolge kommt es jeweils zur Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen den Cysteinresten 7 und 94, 72 und 77, 101 und 128 sowie 179 und 226. Da das Strukturmodell nur für die Reste 9 bis 406 erstellt werden konnte, ist die erste Disulfidbrücke (Cys7 – Cys94) nicht enthalten. Die übrigen Disulfidbrücken wurden mit dem Programm SYBYL (Tripos Inc.) eingeführt und die erhaltene Struktur energieminiert (Abb. 5.46). Dabei waren lediglich für die direkte sequentielle Umgebung der Disulfidbrücke Cys101 – Cys128 geringe Konformationsänderungen notwendig (Abb. 5.46, durch Pfeile markiert), so daß das Strukturmodell die native Disulfidverbrückung sehr gut erfüllt.

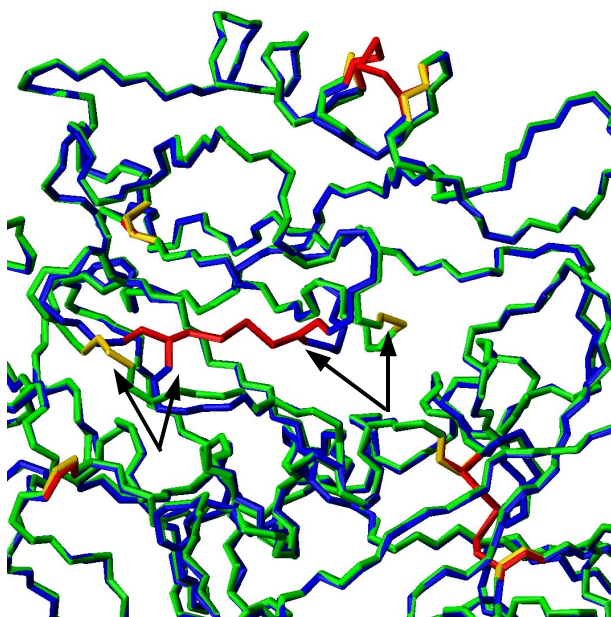


Abbildung 5.46: Ausschnitt aus dem Rückgratverlauf des Strukturmodells der GC-C_{ECD}. Die Einführung der Disulfidbrücke Cys101 – Cys128 erforderte geringe konformationelle Änderungen (Pfeile). Grün: Ohne Disulfidbrücken; blau: nach Einführung der Disulfidbrücken und Energieminimierung. Disulfidbrücken sind rot, Cysteinreste sind rot (nach Einführung) bzw. gelb (fehlende Verbrückung) gefärbt.

5.3.2 Design eines löslichen Rezeptorfragments (miniGC-C)

5.3.2.1 Molekülmodellierung von miniGC-C

Die Kartierung des von Hidaka *et al.* (2002) als μ GC-C bezeichneten Fragments (Abb. 5.45, (a), blauer Bereich) sowie der die Ligandenbindungsregion einschränkenden Mutations- und *Crosslink*-Daten (Wada *et al.*, 1996a; Hasegawa *et al.*, 1999b) auf der Modellstruktur der GC-C_{ECD} erlaubt eine Eingrenzung der für die Ligandenbindung verantwortlichen Bereiche auf die proximale Subdomäne. Basierend auf der Annahme, daß die beiden Subdomänen der GC-C_{ECD} eigenständige Faltungseinheiten darstellen, war das Design einer separaten proximalen Domäne naheliegend. Ein derartiges Rezeptorfragment (im Weiteren als miniGC-C bezeichnet) sollte durch die in Abbildung 5.45 (b) dargestellten Schnitte in der Verbindungsregion erhalten werden. Um eine durchgehende Aminosäuresequenz für die gesamte Domäne zu erhalten, war eine Verknüpfung von zwei der durch die Schnitte entstehenden Termini notwendig. Für die mit $\beta 1$ und $\beta 2$ bezeichneten antiparallelen Faltblattstränge (Abb. 5.45, (b)) wurde dem GC-C_{ECD}-Strukturmodell ein Abstand von nur etwa 6,7 Å entnommen, so daß eine direkte Verbindung beider Stränge durch eine geeignete Schleifensequenz möglich erschien.

Die schließlich für die Konstruktion von miniGC-C verwendeten Sequenzabschnitte umfaßten die Bereiche von Ser139 bis Leu276 und Thr355 bis Gln407. Dabei wurden folgende Auswahlkriterien verwendet: Die mit $\alpha 1$ bezeichnete Helix (Abb. 5.45, (b) und 5.47) wird NH₂-terminal durch die Aminosäuren Arginin und Lysin begrenzt, die eher destabilisierend auf den Helixdipol wirken (Shoemaker *et al.*, 1987). NH₂-terminal unmittelbar vor diesen Resten befindet sich jedoch eine Ser-Pro-Ala-Sequenz (Abb. 5.47), die, basierend auf der sequenzspezifischen Häufigkeit dieser Aminosäuren am NH₂-Terminus von Helices, eine eher stabilisierende Funktion besitzen sollte (Richardson & Richardson, 1988). Daher wurde als NH₂-terminale Aminosäure Ser139 gewählt, um als mögliches „N-Cap“ die Ausbildung der Helix $\alpha 1$ zu begünstigen. Der Faltblattstrang $\beta 1$ wird COOH-terminal durch Thr275 und $\beta 2$ wird NH₂-terminal durch Met356 begrenzt (Abb. 5.47). Da Threonin als in β -Position verzweigte Aminosäure häufig in Faltblättern zu finden ist (Minor & Kim, 1994), wurde Thr355 als zusätzlicher Rest am NH₂-Terminus von $\beta 2$ gewählt. Schließlich wurde Leu276 aufgrund der geringen Distanz von etwa 6,9 Å zu Thr355 als COOH-Terminus von $\beta 1$ verwendet.

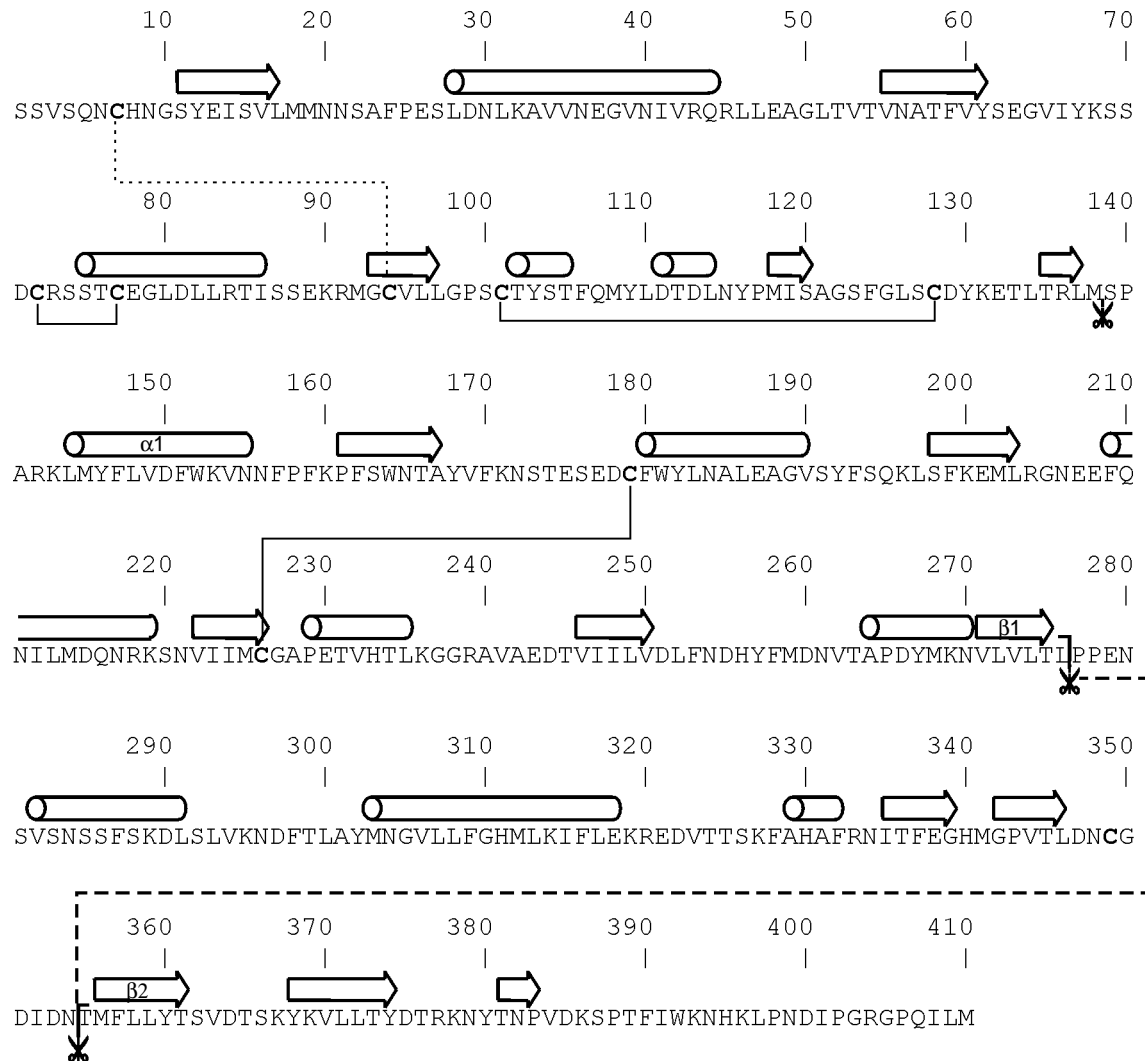


Abbildung 5.47: Aminosäuresequenz der porcinen GC-C_{ECD}. Die dargestellten Elemente regulärer Sekundärstruktur wurden dem Strukturmodell (Abb. 5.45) entnommen. Die von Dr. Yuji Hidaka (Osaka, Japan) bestimmte Disulfidverbrückung ist angezeigt und die in dem Strukturmodell nicht enthaltene Disulfidbrücke Cys7 – Cys94 ist gepunktet dargestellt. Die für die Konstruktion der proximalen Subdomäne (miniGC-C) gewählten Bereiche/Schnitte sind durch Scheren verdeutlicht, die Verbindung der Faltblattstränge $\beta 1$ und $\beta 2$ (gestrichelte Linie) erfolgte durch die Sequenz Ala-Pro-Gly-Asp.

Die Verbindung der Faltblattstränge $\beta 1$ und $\beta 2$ wurde durch die Verwendung der Tetrapeptidsequenz Ala-Pro-Gly-Asp realisiert. Diese Aminosäuren sind sehr häufig an der Ausbildung von Umkehrschleifen (*turns*) bei antiparallelen Faltblättern beteiligt und wurden entsprechend ihrer sequenzspezifischen Häufigkeit in solchen *turn*-Strukturen ausgewählt (Crasto & Feng, 2001).

Basierend auf diesen Überlegungen wurde dann mit den Programmen SWISS-PDBViewer und SWISS-MODEL (Guex & Peitsch, 1997) und der Modellstruktur der GC-C_{ECD} als Matrize ein Strukturmodell von miniGC-C (entspricht Ser139-Leu276-(Ala-Pro-Gly-Asp)-

Thr355-Gln407) erstellt (Abb. 5.48, (a)). Der Vergleich mit der gesamten GC-C_{ECD} zeigt, daß die gewählte Schleifensequenz eine Verbindung der beiden Faltblattstränge ohne deren konformationelle Veränderung erlauben sollte (Abb. 5.48, (b), durch rote Pfeile markiert).

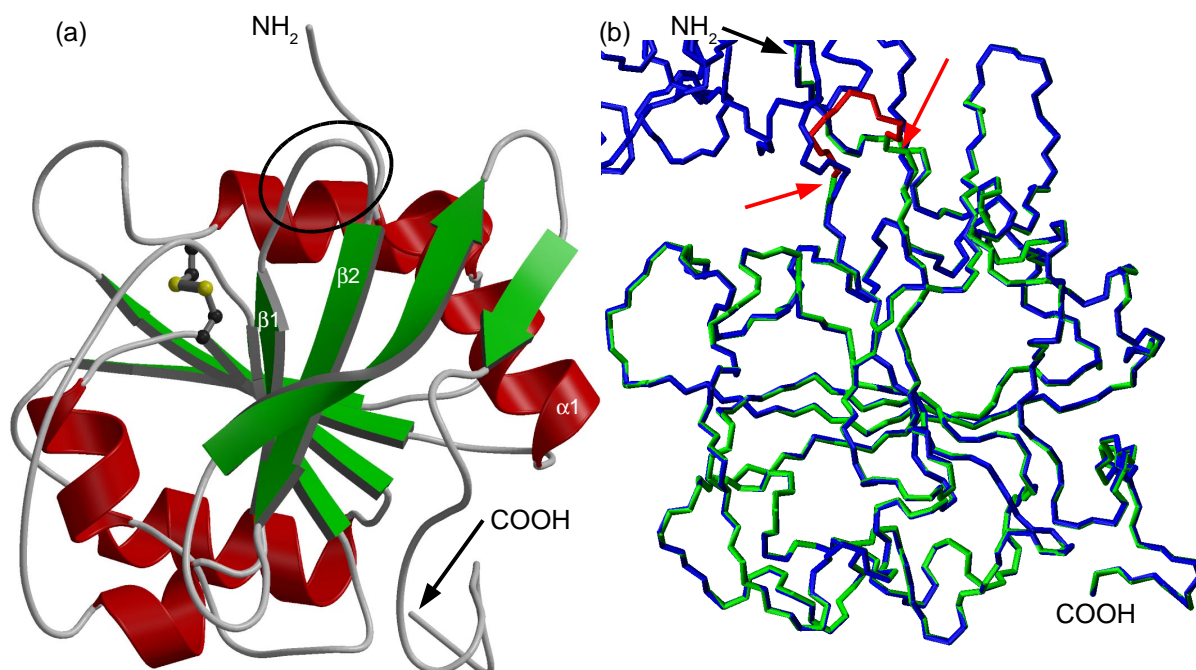


Abbildung 5.48: (a) Schematische Darstellung des Strukturmodells von miniGC-C. Die die Faltblattstränge $\beta 1$ und $\beta 2$ verbindende Schleifensequenz Ala-Pro-Gly-Asp ist gekennzeichnet. Die verbleibende Disulfidbrücke (Cys41 – Cys88; entspricht Cys179 – Cys226 der GC-C_{ECD}) ist als Stäbchenmodell, Helices sind in rot und Faltblattstränge sind in grün dargestellt. (b) Überlagerung der Rückgratverläufe der Strukturmodelle der GC-C_{ECD} (blau) und miniGC-C (grün). Die Ala-Pro-Gly-Asp-Sequenz ist rot gefärbt, die Termini der Faltblattstränge $\beta 1$ und $\beta 2$ sind mit roten Pfeilen, der NH_2 -Terminus von miniGC-C ist mit einem schwarzen Pfeil markiert.

Für weitere Untersuchungen sollte miniGC-C kloniert und als Thioredoxin-Fusionsprotein in *E. coli* Origami(DE3) exprimiert werden.

5.3.2.2 Klonierung von miniGC-C

Für die Verknüpfung der Bereiche von Ser139-Leu276 und Thr355-Gln407 über die Ala-Pro-Gly-Asp-Sequenz wurde die *splicing-by-overlap-extension*-PCR-Mutagenese verwendet (Kapitel 4.8.3). Als Matrize diente die von Dr. Yuji Hidaka (Osaka, Japan) zur Verfügung gestellte cDNA der porcinen GC-C_{ECD}, die verwendeten Primer waren die Oligonukleotide miniGC-C_1 (Primer 1), miniGC-C_2 (Primer 3), miniGC-C_3 (Primer 4) und betaGC-3' (Primer 2; für alle Primer: siehe Kapitel 3.3). Nach allen PCR-Schritten wurden die Produkte

mittels Agarosegelelektrophorese (Kapitel 4.3.1) getrennt und die entsprechenden Banden extrahiert (Kapitel 4.6.3). Durch die verwendeten Primer wurde am 5'-Ende des miniGC-C-Gens eine *Xba*I- und eine *Bgl*II-Schnittstelle sowie eine Erkennungssequenz für die Proteinase PreScission und am 3'-Ende eine *Bam*HI-Schnittstelle eingeführt. Die mutierte DNA wurde gleichzeitig mit *Bam*HI und *Xba*I restringiert (Kapitel 4.7.1), in doppelt verdauten, dephosphorylierten pBlueskript II KS ligiert (Kapitel 4.7.3) und nach Butanolfällung (Kapitel 4.6.1) in elektrokompente *E. coli* Top10-Zellen (Kapitel 3.1.1) eingebracht (Kapitel 4.9.2). Nach blau-weiß-*screening* und Kolonie-PCR (Primer: Oligonukleotide miniGC-C_1 und betaGC-3') der *E. coli* Top10-Transformanten wurde die Plasmid-DNA (pBlueKS-miniGC-C) isoliert (Kapitel 4.5) und die richtige Nukleotidsequenz durch Sequenzierung (Kapitel 4.7.4) bestätigt (vgl. Kapitel 10.1.1).

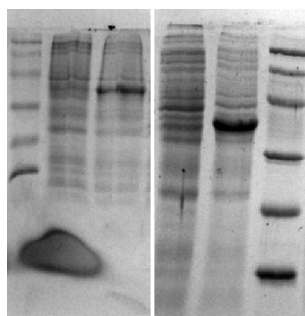
Nach dem anschließenden Verdau von pBlueKS-miniGC-C mit *Bgl*II und *Bam*HI wurde der Restriktionsansatz mittels Agarosegelelektrophorese (Kapitel 4.3.1) getrennt und die dem miniGC-C-Gen entsprechende Bande extrahiert (Kapitel 4.6.3). Das erhaltene Fragment wurde dann in doppelt verdauten, dephosphorylierten pET-32a ligiert (Kapitel 4.7.3) und nach Butanolfällung (Kapitel 4.6.1) in elektrokompente *E. coli* Top10-Zellen eingebracht (Kapitel 4.9.2). Nach erneuter Kolonie-PCR (Primer: Oligonukleotide miniGC-C_1 und betaGC-3') der *E. coli* Top10-Transformanten wurde die Plasmid-DNA (pET-32a-pres-miniGC-C) isoliert (Kapitel 4.5). pET-32a-pres-miniGC-C kodiert für rekombinantes miniGC-C mit NH₂-terminalem Thioerodoxin-Anhang und einer Erkennungssequenz für die Proteinase PreScission.

5.3.2.3 Expression von miniGC-C

Die Expression von miniGC-C erfolgte in *E. coli* Origami(DE3)-Zellen (Kapitel 3.1.2). Die Untersuchung auf die IPTG induzierbare Expression des Fusionsproteins erfolgte wie bereits in den Kapiteln 4.11.1 und 5.1.2 beschrieben. Nach Induktion durch Zugabe von IPTG zu einer Endkonzentration von 1 mM erfolgte die weitere Inkubation bei 37 °C bzw. bei 30 °C. Die Bildung der Fusionsproteine wurde durch elektrophoretische Analyse (Kapitel 4.3.2) von vor und nach Induktion entnommen Zellen untersucht (Abb. 5.49).

Das Thioerodoxin-Fusionsprotein Trx-Pres-miniGC-C besitzt ein theoretisches Molekulargewicht von 39,8 kDa. Die nach Induktion auftauchende Proteinbande liegt daher mit einem apparenten Molekulargewicht von etwa 39 kDa im erwarteten Größenbereich (Abb. 5.49).

Abhängig von der während der Expression vorherrschenden Temperatur werden jedoch deutliche Unterschiede bei den Expressionsraten beobachtet. Im Vergleich mit der Induktion bei 30 °C kann bei einer Induktionstemperatur von 37 °C eine deutlich bessere Überexpression des Fusionsproteins festgestellt werden. Daher schien das gewählte Expressionssystem und eine Temperatur von 37 °C für die rekombinante Expression von miniGC-C als Thioredoxin-Fusionsprotein geeignet.



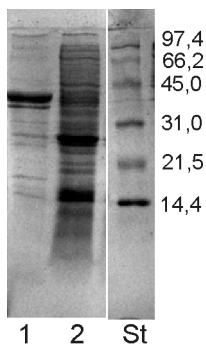
St 1 2 3 4 St

Abbildung 5.49: Expressionsversuche von miniGC-C als Thioredoxin-Fusionsprotein in *E. coli* Origami(DE3). Die Induktion erfolgte bei 30 °C (Bahnen 1 und 2) bzw. bei 37 °C (Bahnen 3 und 4). Jeweils vor nach Induktion entnommene Zellen sind analysiert (Kapitel 4.11.1). Bahnen 1 und 3: vor Induktion; Bahnen 2 und 4: 3 h nach Induktion. St: *low range*-Proteinstandard (in kDa).

Zellaufschluß

Da miniGC-C eine Disulfidbrücke besitzt, sollte die Expression wie bei rekombinantem Proguanylin in einem geeigneten Bakterienstamm mit oxidativem Cytoplasma erfolgen (Kapitel 5.1.2) und für die Reinigung von miniGC-C sollte ebenfalls ausschließlich der lösliche Überstand nach Zellaufschluß verwendet werden (Kapitel 5.1.3).

Nach dem Aufschluß der *E. coli* Origami(DE3)-Zellen (Kapitel 4.12.1) war praktisch kein Thioredoxin-Fusionsprotein im Rohextrakt enthalten (Abb. 5.50), und die Menge des Fusionsproteins im Rohextrakt war unabhängig von der gewählten Induktionstemperatur.



1 2 St

Abbildung 5.50: Elektrophoretische Analyse (Kapitel 4.3.2) nach dem Aufschluß von *E. coli* Origami(DE3)-Zellen nach Expression des Thioredoxin-Fusionsproteins Trx-Pres-miniGC-C. Bahn 1: Zelltrümmer; Bahn 2: Rohextrakt; St: *low range*-Proteinstandard (in kDa).

5.3.2.4 Bindung des hitzestabilen Enterotoxins STp an miniGC-C

In ihrer Diplomarbeit konnte Naomi Tidten (Lehrstuhl für Biopolymere, Universität Bayreuth) zeigen, daß miniGC-C als Thioredoxin-Fusionsprotein in löslicher Form in *E. coli* AD494(DE3)-Zellen exprimiert werden kann (Tidten, 2003). Die anschließende Reinigung erfolgte analog zu der von Proguanylin (Kapitel 5.1.3) durch Co^{2+} -Ionen-Affinitätschromatographie, Spaltung des Fusionsproteins mit PreScission und erneute Chromatographie an einer TALONTM-Säule (Tidten, 2003).

Das auf diese Weise exprimierte und gereinigte miniGC-C war ein lösliches, strukturiertes Protein, für das die spezifische Bindung des pathogenen GC-C-Liganden STp-(5-17) nachgewiesen werden konnte. Da an der Ligandenbindung ein Tryptophanrest der GC-C_{ECD} beteiligt ist (Hasegawa *et al.*, 1999b), konnte mittels Fluoreszenztitrationsexperimenten eine Dissoziationskonstante (K_D) für den Komplex aus miniGC-C und STp-(5-17) bestimmt werden (Abb. 5.51; Tidten, 2003). Der resultierende K_D -Wert lag mit 13 ± 7 nM etwa eine Größenordnung über den für die Mikrodomäne ($\text{IC}_{50} = 10$ nM; Hidaka *et al.*, 2002) und die gesamte GC-C_{ECD} ($K_D = 0,4$ nM; Hasegawa *et al.*, 1999a) bestimmten Werten.

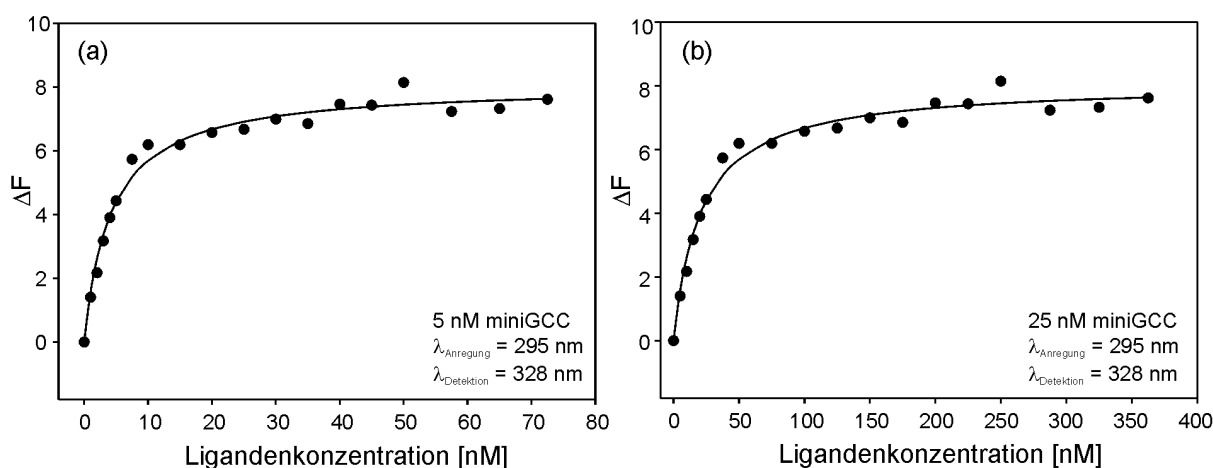


Abbildung 5.51: Änderung der Tryptophanfluoreszenz (ΔF) von miniGC-C bei Zugabe des Liganden STp-(5-17) in Konzentrationen von 0 nM bis 400 nM. Die eingesetzten miniGC-C-Konzentrationen waren 5 nM (a) und 25 nM (b). Die Anregungswellenlänge lag bei 295 nm und die Fluoreszenz wurde bei einer Emissionswellenlänge von 328 nm gemessen (aus: Tidten, 2003).

6. Diskussion

6.1 Das humane Prohormon Proguanylin

6.1.1 Expression und Reinigung

Frühere NMR-spektroskopische Untersuchungen hatten gezeigt, daß die homonuklearen Spektren von natürlichem Proguanylin aufgrund zahlreicher überlagerter Resonanzen keine vollständige Zuordnung der Spinsysteme und somit auch keine Strukturbestimmung ermöglichten (Schulz *et al.*, 1999). Die sequenzspezifische Zuordnung der Resonanzen und die anschließende Strukturbestimmung in Lösung erforderte daher die Durchführung dreidimensionaler NMR-Experimente und eine damit verbundene Markierung von Proguanylin mit den NMR-aktiven Isotopen ^{13}C und ^{15}N . Um die Isotopenmarkierung durchführen und ausreichende Mengen des markierten Proteins für die Herstellung hochkonzentrierter Proteinlösungen ($\approx 1 \text{ mM}$) gewinnen zu können, wurde ein effektives Expressionssystem benötigt. In früheren Arbeiten wurde bereits ein System für die Expression eines disulfidverbrückten Proteins als lösliches Thioredoxin-Fusionsprotein im oxidativen Cytoplasma eines Thioredoxin Reduktase defizienten *E. coli*-Stamms erfolgreich angewandt (Lauber *et al.*, 2001). Daher sollte die Übertragbarkeit dieses Systems auf andere disulfidverbrückte Proteine anhand der Expression von Proguanylin nachgewiesen werden.

Bei diesen früheren Arbeiten waren bei der Proteinasebehandlung des Fusionsproteins zum Entfernen des Thioredoxin-Anhangs Probleme bezüglich der Aktivität und Spezifität der verwendeten Proteinasen aufgetreten (Lauber *et al.*, 2001). Daher wurden für die Expression von rekombinantem Proguanylin parallel mehrere Klone hergestellt, die sich ausschließlich in den Erkennungssequenzen der jeweiligen Proteinase unterschieden (Kapitel 5.1.1).

Für alle Thioredoxin-Fusionsproteine (Trx-EK-, Trx-Xa-, Trx-Pres- und Trx-Asp-Pres-Proguanylin) konnte nach Induktion mit IPTG eine ähnlich hohe Expressionsrate in *E. coli* AD494(DE3) erreicht werden (Kapitel 5.1.2, Abb. 5.1), so daß das gewählte System für die Expression von rekombinantem Proguanylin geeignet war. Die Fusionsproteine wurden dann mittels Affinitätschromatographie an einer Cobaltsäule aus den löslichen Überständen nach Zellaufschluß gewonnen (Kapitel 5.1.3.2, Abb. 5.3).

6.1.1.1 Behandlung der Fusionsproteine mit Proteinasen

Enterokinase und Faktor Xa sind aufgrund ihrer Spezifität (EK: DDDDK↓; Xa: IEGR↓) die einzigen kommerziell erhältlichen Proteinasen, die eine Freisetzung von Proguanylin mit der natürlichen Sequenz, also ohne NH₂-terminalen Überhang ermöglichen. Da der Vektor pET-32a (Tabelle 3.2) nicht für die Spaltung von Fusionsproteinen mit Faktor Xa konzipiert ist, waren schon früher beobachtete sekundäre Spaltungen nach dem Argininrest der in pET-32a enthaltenen Thrombin-Spaltstelle und weiteren in der Linkerregion zwischen Thioredoxin und Zielprotein enthaltenen Argininresten zu erwarten (Lauber *et al.*, 2001). Nach Inkubation mit Faktor Xa wurde mehr als 90 % des Fusionsproteins umgesetzt, wobei neben den erwarteten weitere sekundäre Spaltungen beobachtet wurden (Kapitel 5.1.3.3, Abb. 5.4). Diese erfolgten vermutlich nach einem der drei in der Proguanylin-Sequenz enthaltenen Argininreste. Die Inkubation mit Enterokinase führte ebenfalls zu einer praktisch vollständigen spezifischen Spaltung des Fusionsproteins (Trx-EK-Proguanylin), jedoch kam es auch bei Verwendung dieser Proteinase zu sekundären Spaltungen (Abb. 5.4).

Im Gegensatz zu den beiden letztgenannten Proteinasen führte die Behandlung von Trx-Pres-Proguanylin mit PreScission zu einer spezifischen Spaltung in der Proteinase-Erkennungssequenz (LEVLFQ↓GP) und einer nahezu vollständigen Umsetzung des Fusionsproteins (Abb. 5.4, (c)). Daher mußte die durch die PreScission-Spaltung erhaltene, im Vergleich mit dem natürlichen Protein zusätzliche Gly-Pro-Sequenz am NH₂-Terminus von rekombinantem Proguanylin in Kauf genommen werden.

Im Weiteren wurde rekombinantes Proguanylin durch erneute Chromatographie an einer Cobaltsäule erhalten (Kapitel 5.1.3.4, Abb. 5.5, (c)). Eventuell noch vorhandene Verunreinigungen und die Proteinase konnten schließlich durch eine abschließende Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (RP-HPLC) abgetrennt werden (Kapitel 4.13.3, 5.1.3.5, 5.1.4.6).

6.1.1.2 Abhängigkeit der Löslichkeit der Fusionsproteine von der Polarität der Proteinase-Erkennungssequenz

Bei der Expression von Proguanylin als Fusionsprotein mit Thioredoxin war eine Abhängigkeit der Löslichkeit dieser Fusionsproteine von der Polarität der spezifischen Erkennungssequenzen der Proteinasen Enterokinase, Faktor Xa und PreScission aufgefallen (Kapitel 5.1.3.1): Eine abnehmende Polarität der Erkennungssequenz (Polarität: EK > Xa >

Pres) korrelierte mit einer deutlichen Abnahme des Fusionsproteinanteils im löslichen Überstand nach Zellaufschluß (Abb. 5.2), so daß nur sehr geringe Mengen des löslichen Thioredoxin-Fusionsproteins mit PreScission-Spaltstelle erhalten wurden. Da diese Proteinase jedoch aufgrund ihrer hohen Spezifität erforderlich war (s.o.) und eine Reinigung der Fusionsproteine aus Einschlußkörperchen vermieden werden sollte (Kapitel 5.1.3.1), wurde die Löslichkeit von Trx-Pres-Proguanylin gezielt durch den Einbau einer Asp₅-Sequenz NH₂-terminal unmittelbar vor die PreScission-Spaltstelle erhöht (Abb. 5.2, (d)).

Der Expressionsvektor pET-32a wurde ursprünglich entwickelt, um durch die NH₂-terminale Fusion mit Thioredoxin die Löslichkeit der im Cytoplasma von *E. coli* gebildeten heterologen Proteine zu steigern (LaVallie *et al.*, 1993). Da natürliches Proguanylin *in vitro* in Konzentrationen bis mindestens 2,4 mM gelöst werden kann (Schulz *et al.*, 1999), sollte es sich bei den Proteinen Trx-EK-, Trx-Xa-, Trx-Pres- und Trx-Asp-Pres-Proguanylin um die ebenfalls löslichen Fusionen zweier löslicher Proteine handeln. Dies war jedoch nur für die Proteine Trx-EK-, Trx-Xa- und Trx-Asp-Pres-Proguanylin der Fall (Abb. 5.2). Die Beobachtung eines nur schwer löslichen und leicht aggregierenden Fusionsproteins (Trx-Pres-Proguanylin; Abb. 5.2, (c)) hebt daher die Bedeutung weiterer Faktoren hervor, die einen möglichen Einfluß auf die Löslichkeit der in *E. coli* gebildeten heterologen Proteine besitzen. Insbesondere bei einer strukturell bedingten fixierten Lage, wie es aufgrund der Proguanylin-Struktur (Kapitel 5.1.5.7) der Fall ist, scheint die Polarität der die beiden Fusionspartner verbindenden Linkersequenz von Bedeutung zu sein. Ein derartiger Einfluß der Proteinase-Erkennungs- bzw. Linkersequenz wurde in der Literatur bislang nicht beschrieben, sollte jedoch als mögliche Ursache für die Bildung von Einschlußkörperchen bei der rekombinanten Expression von Proteinen als Fusionsprotein berücksichtigt werden.

6.1.2 Charakterisierung von rekombinantem Proguanylin

Durch NH₂-terminale Sequenzierung (Kapitel 5.1.4), die Aufnahme von Massenspektren (Kapitel 4.16), Elektropherogrammen (Kapitel 4.3.3) und Umkehrphasen-Flüssigkeitschromatogrammen (RP-HPLC; Kapitel 4.13.3) konnte eindeutig nachgewiesen werden, daß es sich bei dem gereinigten Protein um Proguanylin handelte (Kapitel 5.1.4.1, 5.1.4.2). Mit Hilfe der genannten Methoden konnten durch den Vergleich mit dem natürlichen, aus menschlichem Hämofiltrat isolierten Protein (IPF PharmaCeuticals, Hannover) gleichzeitig übereinstimmende biophysikalische Eigenschaften, wie Größe, Ladungsdichte und

Hydrophobizität nachgewiesen werden (Kapitel 5.1.4.2). Die zusätzliche Gly-Pro-Sequenz am NH₂-Terminus von rekombinantem Proguanylin schien diese Größen nicht signifikant zu beeinflussen (Lauber *et al.*, 2002).

Für die biologische Aktivität benötigt das Peptidhormon Guanylin zwei, in einer 1-3/2-4 Anordnung verknüpfte Disulfidbrücken (entsprechend Cys83 – Cys91, Cys86 – Cys94 von Proguanylin), für deren korrekte Ausbildung die gesamte Prosequenz benötigt wird (Kapitel 1.5.2; Schulz *et al.*, 1999). Um für das rekombinant hergestellte Prohormon diese native Disulfidverbrückung nachzuweisen, wurde das Proguanylin-Fragment Pro80-Cys94 durch saure Hydrolyse mit Essigsäure freigesetzt (Kapitel 4.14). Bei der nachfolgenden analytischen RP-HPLC-Untersuchung wurde für dieses Fragment der für die topologischen Guanylin-Isomere (Kapitel 1.3.2) charakteristische Doppelpack identifiziert (Kapitel 5.1.4.3, Abb. 5.8). Zusammen mit der biologischen Aktivität des untersuchten Fragments (Kapitel 5.1.4.4, Abb. 5.9) konnte somit eindeutig die native Disulfidverbrückung der Hormonregion von Proguanylin nachgewiesen werden. Da die Massenspektren von Proguanylin (Kapitel 5.1.4.1, Abb. 5.6) eine vollständige Oxidation aller Cysteinreste verifiziert hatten, bestätigten diese Ergebnisse indirekt die Ausbildung der dritten Disulfidbrücke unter Einbeziehung von Cys48 und Cys61 (Lauber *et al.*, 2002).

6.1.2.1 CD-spektroskopische Untersuchungen

Neben den bislang beschriebenen Gemeinsamkeiten von rekombinantem und natürlichem Proguanylin konnte durch den Vergleich der CD- und 1D-¹H-NMR Spektren beider Proteine auch eine übereinstimmende Sekundär- und Tertiärstruktur nachgewiesen werden (Kapitel 5.1.4.5, 5.1.4.6; Abb. 5.10, 5.11; Lauber *et al.*, 2002).

Die Fern-UV-CD-Spektren von rekombinantem und natürlichem Proguanylin zeigten praktisch keine Veränderung für pH-Werte zwischen 4,0 und 7,4 (Kapitel 5.1.4.5, Abb. 5.10), so daß eine Abhängigkeit der Sekundärstruktur in diesem pH-Bereich ausgeschlossen wurde. Daher konnten die Pufferbedingungen für die nachfolgenden NMR-spektroskopischen Untersuchungen in einem für diese günstigen Bereich gewählt werden. Der letztendlich verwendete pH-Wert von 6,0 (Kapitel 4.19.1) liegt zwischen dem theoretischen pI von Proguanylin von 4,56 (<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>) und dem physiologischen pH von 7,4. Im Vergleich zu pH 7,4 ist die Austauschrate der Amidprotonen bei pH 6 jedoch deutlich langsamer (Wüthrich, 1986), so daß dieser pH-Wert für die NMR

Spektroskopie geeigneter ist.

Neben der aus den CD-Spektren von rekombinantem und natürlichem Proguanylin abgeleiteten übereinstimmenden Sekundärstruktur zeigten beide Proteine auch das gleiche Verhalten bei der thermischen Denaturierung, die in beiden Fällen nicht vollständig reversibel war (Abb. 5.10). Die jeweiligen Experimente wurden jedoch bei einer langsamen Heiz- und Abkühlrate (1 °C/min) durchgeführt (Kapitel 4.18.2), so daß eine durch die anhaltende Erwärmung katalysierte Hydrolyse der labilen Asp79-Pro80-Bindung (s.o.) als mögliche Ursache für die fehlende Reversibilität in Frage kommt. Diese Vermutung wird durch die vollständige Reversibilität der thermischen Denaturierung aller Proguanylin-Mutanten (Kapitel 5.2) bei einer schnellen Heiz- und Abkühlrate unterstützt (Abb. 5.35, 5.38, 5.41).

Die bei 90 °C aufgenommenen Spektren zeichnen sich für alle Proguanylin-Varianten durch einen praktisch übereinstimmenden Verlauf aus (Kapitel 5.1.4.5, 5.2.3.2, 5.2.4.1, 5.2.5.1; Abb. 5.10, 5.35, 5.38, 5.41). Hinweise auf eine durch die hohe Temperatur verursachte signifikante Zunahme unstrukturierter Bereiche waren die deutliche Verschiebung der Nulldurchgänge und der absoluten Minima bei etwa 205 nm zu kleineren Wellenlängen (Greenfield & Fasman, 1969). Da durch die Erwärmung eine Abnahme der gesamten Signalintensität von nur ungefähr 40 % beobachtet wurde (Abb. 5.10, 5.35, 5.41), schienen die bei 90 °C erhaltenen Spektren für einen signifikanten Anteil stabiler Sekundärstruktur zu sprechen. Wahrscheinlicher ist jedoch ein bei der hohen Temperatur verstärkter Beitrag der aromatischen Aminosäuren, insbesondere von Tyr88, zum CD-Signal (Chakrabartty *et al.*, 1993). Im Gegensatz zu den übrigen Varianten, kam es bei der thermischen Denaturierung der bei Raumtemperatur unstrukturierten Mutante Proguanylin-C48S/C61S zu einer Abnahme der mittleren molaren Elliptizität zwischen 215 nm und 240 nm (Kapitel 5.2.4.1, Abb. 5.38). Ein ähnliches Verhalten wurde unter anderem schon bei der thermischen Denaturierung von Barstar (Inhibitor der *Bacillus amyloliquefaciens* RNase) in Gegenwart von 3 M Guanidinium Hydrochlorid beobachtet und kann nicht als ein Hinweis auf die Induktion von Sekundärstrukturanteilen gedeutet werden (Agashe & Udgaonkar, 1995). Die aromatischen Seitenketten von Tyrosin und Tryptophan können ebenfalls Beiträge zu den Fern-UV-CD-Spektren eines Proteins bei etwa 222 nm leisten (Chakrabartty *et al.*, 1993), so daß es sich im Fall von Proguanylin-C48S/C61S bei der Abnahme der Elliptizität in diesem Wellenlängenbereich um einen temperaturabhängigen Beitrag von Tyr88 handeln könnte. Da sich das bei 90 °C erhaltene Spektrum dieser Mutante (Proguanylin-C48S/C61S) ausschließlich durch

eine etwas geringere Signalintensität von denen der übrigen Proguanylin-Varianten unterscheidet, muß auch für die bei 90 °C erhaltenen Spektren dieser Proteine eher von einem aromatischen Beitrag als von einer residualen Sekundärstruktur ausgegangen werden.

6.1.2.2 Analytische Ultrazentrifugation

Für die homologen Prohormone Proguanylin und Prouroguanylin wurde, basierend auf der Funktion der Prosequenzen bei der *in vitro* oxidativen Faltung (Schulz *et al.*, 1999; Hidaka *et al.*, 1998) und dem für beide Proteine beobachteten ungewöhnlichen Elutionsverhalten bei der Größenausschlußchromatographie (Schulz *et al.*, 1999; Hidaka *et al.*, 2000), ein stabiler dimerer Zustand in Lösung angenommen (Hidaka *et al.*, 2000). Hidaka *et al.* (2000) postulierten sogar eine Einbeziehung der Dimerbildung in den Faltungsweg von Prouroguanylin und nahmen einen für die Dimerisierung kritischen Konzentrationsbereich zwischen 1 und 10 µM an. Für natürliches Proguanylin hingegen konnte mittels Größenausschlußchromatographie und NMR Diffusionsmessungen keine Änderung des Oligomerzustandes zwischen 1 µM und 2,4 mM festgestellt werden (Schulz *et al.*, 1999). Da die Ausbildung intermolekularer Disulfidbrücken bei einer möglichen Dimerisierung durch die Aufnahme von Massenspektren ausgeschlossen wurde (Kapitel 5.1.4.1; Schulz *et al.*, 1999) und eine reversible Oligomerisierung normalerweise von der Gesamtkonzentration abhängt, waren diese Ergebnisse bereits ein Hinweis auf einen monomeren Assoziationsgrad von Proguanylin. Die genannten Hinweise konnten ein möglicherweise sehr stabiles Dimer jedoch nicht ausschließen. Für die Interpretation der aus den NOESY Spektren abgeleiteten Distanzinformationen zur Strukturbestimmung von Proguanylin in Lösung war allerdings eine exakte Kenntnis des Oligomerzustandes erforderlich. Daher wurden Sedimentationsexperimente mit natürlichem und rekombinantem Proguanylin zur Untersuchung des Assoziationsgrades in Lösung durchgeführt (Kapitel 5.1.4.7). Die Sedimentationsgeschwindigkeits-Experimente wurden dabei mit neuesten Methoden analysiert, um die während der Sedimentation auftretende Diffusion zu berücksichtigen (Schuck, 1998; Schuck, 2000; Schuck *et al.*, 2002; Lauber *et al.*, 2002).

Für den untersuchten Konzentrationsbereich konnte durch die Analyse der Sedimentationsgeschwindigkeits- und Sedimentationsgleichgewichts-Experimente eindeutig das Vorliegen eines Proguanylin-Monomers nachgewiesen werden (Kapitel 5.1.4.7). Während für das natürliche Protein die Analyse der erhaltenen Sedimentationsprofile auch bei millimolarer

Konzentration eindeutig war, wurde bei den Sedimentationsgleichgewichts-Experimenten mit rekombinantem Proguanylin eine zusätzliche hochmolekulare Komponente (etwa 49 kDa) beobachtet. Diese war vermutlich für die geringere Qualität der angepaßten Sedimentationsgeschwindigkeits-Daten der 1 mM konzentrierten Probe verantwortlich. Da die Qualität der an Gleichung 4.5 (Kapitel 4.17.1) angepaßten Sedimentationsgleichgewichts-Daten bei der Berücksichtigung eines geringen Dimeranteils deutlich schlechter wurde, die Berücksichtigung von 3-10 % einer hochmolekularen Komponente (49 kDa) jedoch zu einer signifikanten Verbesserung führte, schien es sich tatsächlich um eine Verunreinigung zu handeln. Weitere diese Annahme unterstützende Hinweise waren eine fehlende konzentrationsabhängige Zunahme dieser Komponente, sowie deren Fehlen in der natürlichen Proguanylin-Probe. Ein möglicher Beitrag der Verunreinigung zu den Fern-UV-CD-Spektren von Proguanylin konnte jedoch durch den Vergleich der Spektren des rekombinanten mit denen des natürlichen Proteins ausgeschlossen werden.

Die Durchführung und Analyse von Sedimentationsgeschwindigkeits- und Sedimentationsgleichgewichts-Experimenten bei Proteinkonzentrationen von 450 und 900 μ M ermöglichte auch für Proguanylin- Δ (28-37) einen eindeutigen Nachweis über das Vorliegen eines Monomers in Lösung (Kapitel 5.2.3.1). Auch im Fall dieser Deletionsmutante war bei der Auswertung der Sedimentationsgleichgewichts-Experimente die Berücksichtigung hochmolekularer Verunreinigungen (0,4-8 %; 26-111 kDa) notwendig, die vermutlich aufgrund ihres geringen Anteils nicht in den Sedimentationskoeffizienten- und Molekulargewichtsverteilungen (Abb. 5.33) der Sedimentationsgeschwindigkeits-Experimente identifiziert werden konnten. Für die Durchführung aller in dieser Arbeit beschriebenen Sedimentationsexperimente wurde jeweils RP-HPLC-gereinigtes rekombinantes und natürliches Protein eingesetzt (Kapitel 4.13.3). Wie aus der gelelektrophoretischen Analyse der RP-HPLC-Fractionen von Proguanylin- Δ (28-37) hervorgeht (Kapitel 5.2.2, Abb. 5.29), handelt es sich bei den beobachteten Verunreinigungen um äußerst geringe Mengen (< 5 %) zellulärer Proteine mit Molekulargewichten zwischen etwa 40 und 100 kDa, die nach diesem Reinigungsschritt noch enthalten waren. Die höhere Qualität der für das natürliche Protein erhaltenen Daten lassen sich somit auf die durch die Herkunft (menschliches Hämofiltrat) begründete höhere Reinheit der Probe zurückführen.

Zusammenfassend haben die durchgeführten Sedimentationsexperimente den postulierten stabilen dimeren Zustand von Proguanylin in Lösung (Hidaka, *et al.*, 2000) eindeutig widerlegt und gleichzeitig den intramolekularen Charakter aller für die Strukturbestimmung verwendeten NOE-Kreuzresonanzen bestätigt. Basierend auf den Sedimentationsdaten von Proguanylin- $\Delta(28-37)$ kann außerdem ein dimerer Oligomerzustand von Prouroguanylin als äußerst unwahrscheinlich angesehen werden. Ergänzend zu den Sedimentationsdaten von natürlichem und rekombinantem Proguanylin erlaubt der Vergleich mit den NMR Diffusionsmessungen von Schulz *et al.* (1999) sogar die Bestätigung eines monomeren Proteins bei einer Konzentration von 2,4 mM (Lauber *et al.*, 2002).

6.1.3 Analyse der Struktur von Proguanylin in Lösung

6.1.3.1 Relevanz der NH₂-terminalen Aminosäuren für die oxidative Faltung

Eine der wichtigsten Funktionen der Guanylin-Prosequenz ist ihr entscheidender Beitrag bei der Ausbildung der nativen, für die biologische Aktivität von Guanylin essentiellen Disulfidisomere. Wie aus unter oxidativen Bedingungen durchgeführten *in vitro* Rückfaltungsexperimenten hervorgeht, sind dabei die NH₂-terminalen Aminosäuren von Proguanylin entscheidend: Fehlen die ersten 31 Proguanylinreste, werden nach der *in vitro* oxidativen Faltung in der Hormonregion fast ausschließlich die nicht-nativen Disulfidisomere erhalten (Schulz *et al.*, 1999). Eine analoge Funktion wurde für die Prosequenz des homologen Uroguanylin-Prohormons beobachtet, bei dem die native Disulfidverbrückung durch Deletion der ersten sechs NH₂-terminalen Aminosäuren *in vitro* und *in vivo* verhindert wird (Hidaka *et al.*, 2000).

In der Proguanylin-Struktur bilden die Reste Thr2 bis Gln4 den mittleren Strang des kurzen dreisträngigen β -Faltblattes (Kapitel 5.1.5.7, Abb. 5.28, $\beta 1$). Eine Deletion der ersten sechs Aminosäuren (Val1 bis Gly6) entspricht demnach einer Deletion des ersten Faltblattstrangs, einschließlich der Schleifenreste Asp5 und Gly6 und führt zu einem Verlust der Wechselwirkungen zwischen den Termini. Diese tertiären Kontakte zwischen Hormonregion und Prosequenz sind demnach für die Ausbildung der nativen Disulfidbrücken essentiell und scheinen für die Hormonkonformation von Bedeutung zu sein (Lauber *et al.*, 2003).

Um der Frage nachzugehen, ob die Faltung der Prosequenz tatsächlich einen direkten Einfluß auf die Struktur der Hormonregion besitzt, wurden die Cysteinreste 86 und 94 jeweils durch Serin substituiert und das mutierte Protein Proguanylin-C86S/C94S spektroskopisch

analysiert (Kapitel 5.2.5). Das Fehlen einer Disulfidbrücke in der Hormonregion sollte deren konformationelle Freiheit gegenüber dem Wildtyp-Protein deutlich erhöhen und dadurch die Wechselwirkungen zwischen den Termini beeinflussen. Wie aus dem ^{15}N editierten 3D-NOESY Spektrum und den sekundären $^1\text{H}\alpha$ Verschiebungen von ^{15}N Proguanylin-C86S/C94S hervorgeht, kommt es praktisch ausschließlich in den Bereichen des dreisträngigen Faltblattes zu strukturellen Veränderungen (Kapitel 5.2.5.2). Vor allem der Verlust der Kontakte zwischen den Faltblattsträngen $\beta 1$ und $\beta 3$ (Kapitel 5.2.5.2) führt dabei zu ausgeprägten Veränderungen der Amidprotonenverschiebungen der betroffenen Reste im ^1H , ^{15}N -HSQC Spektrum (Kapitel 5.2.5.2, Abb. 5.43). Aus der Analyse der sekundären chemischen Verschiebungen der $^1\text{H}\alpha$ Resonanzen konnte für die Aminosäuren Val3, Gln4, Cys91, Thr92 und Gly93 jedoch weiterhin die Tendenz für die Ausbildung einer Faltblattstruktur abgeleitet werden (Abb. 5.44). Diese Tendenz der Reste 91 bis 93 für die Ausbildung der im Prohormon vorliegenden gestreckten Konformation wird für das isolierte Peptidhormon Guanylin (Reste 80-94 von Proguanylin) nicht beobachtet (vgl. Kapitel 5.1.5.3, Abb. 5.20) und wird demnach durch die Struktur der Prosequenz induziert.

Somit wurde ein direkter Einfluß der Struktur der Prosequenz, insbesondere der NH_2 -terminalen β -Haarnadel, auf die Hormonstruktur nachgewiesen. Der Vergleich mit dem Wildtyp-Protein zeigt jedoch, daß erst nach der Ausbildung der nativen Disulfidisomere zahlreiche tertiäre Kontakte ermöglicht werden, die scheinbar stabilisierend auf die Faltblatt- und Hormonstruktur wirken (s.u., Kapitel 6.1.3.3). Diese unterschiedlichen Prozesse – die Beeinflussung der Hormonstruktur durch die Prosequenz einerseits und die Stabilisierung der Tertiärstruktur des Prohormons durch die nativen Disulfidisomere andererseits – weisen auf mögliche kooperative Wechselwirkungen hin, die schließlich die native Disulfidverbrückung ermöglichen.

6.1.3.2 Die Bedeutung der Disulfidbrücke Cys48 – Cys61

Die Funktion der dritten, in Proguanylin vorliegenden Disulfidbrücke zwischen Cys48 und Cys61 war bislang völlig unbekannt. Um einen möglichen Einfluß auf die Struktur des Prohormons bzw. eine Bedeutung bei der Ausbildung der nativen Disulfidisomere in der Hormonregion zu untersuchen, wurden die entsprechenden Cysteinreste jeweils durch Serin substituiert und der Einfluß der Mutation auf die Struktur des mutierten Proteins sowie die Disulfidverbrückung untersucht (Kapitel 5.2.4).

Wie aus den Fern-UV-CD- und ^1H , ^{15}N -HSQC Spektren von Proguanylin-C48S/C61S hervorgeht, hatte die Mutation einen Verlust der zuvor ausgeprägten Sekundär- und Tertiärstruktur des Proteins zur Folge (Kapitel 5.2.4, Abb. 5.38 und 5.39). Durch die kovalente Verknüpfung von Cys48 und Cys61 kommt es in der Proguanylin-Struktur zur Ausbildung einer schleifenartigen Struktur, die den 3_{10} -helikalen Bereich und Helix 2 umfaßt (Kapitel 5.1.5, Abb. 5.25 und 5.28). Da diese Region die Aminosäuren Phe53, Leu57 und Leu60 des hydrophoben Kerns enthält, scheint dieser durch die betroffene Disulfidbrücke stabilisiert zu werden.

Die nachfolgende Analyse der Disulfidverbrückung der Hormonregion von Proguanylin-C48S/C61S ergab einen Anteil von 22 % mit nativer Disulfidisomerie (Kapitel 5.2.4.2), welcher deutlich über dem bei der Reoxidation von isoliertem Guanylin erhaltenen Anteil von 5-10 % liegt (Schulz *et al.*, 1999). Unter Berücksichtigung der durch die Mutation fehlenden definierten Tertiärstruktur und dem nachgewiesenen Einfluß der Struktur der Prosequenz auf die der Hormonregion (Kapitel 6.1.3.1), favorisiert diese Beobachtung eine rein stabilisierende Funktion von Cys48 – Cys61. Die Ausbildung der beobachteten 22 % nativer Disulfidisomere würde sich in diesem Fall auf einen geringen Anteil mit residualer nativer Struktur des Prohormons zurückführen lassen.

6.1.3.3 Stabilisierung der Guanylin A-Form durch die Prosequenz

Das ursprünglich aus dem Dünndarm von Ratten isolierte Peptidhormon Guanylin (Currie *et al.*, 1992) entspricht den 15 COOH-terminalen Aminosäuren Pro80 bis Cys94 der Proguanylin-Sequenz. Wie bereits erwähnt, benötigt Guanylin für seine biologische Aktivität die Ausbildung von zwei in einer 1-3/2-4 Anordnung verknüpften Disulfidbrücken (Kapitel 1.3.1, 5.1.4.4, 6.1.3.1; Klodt *et al.*, 1997) und liegt in Lösung als Gemisch aus zwei ineinander umwandelbaren topologischen Isomeren vor (Kapitel 1.3.2, 5.1.5.3), von denen nur das als A-Isomer bezeichnete biologisch aktiv ist (Schulz *et al.*, 1998). Neben der relativen Orientierung der die Cysteinreste 86 und 91 verbindenden Schleifensequenz bezüglich der durch die Disulfidbrücken (Cys83 – Cys91/Cys86 – Cys94) aufgespannten Ebene (Skelton *et al.*, 1994; Kapitel 1.3.2, Abb. 1.3) lassen sich die beiden Isomere aufgrund ihrer deutlich unterschiedlichen chemischen Verschiebungen voneinander unterscheiden (Skelton *et al.*, 1994; Schulz *et al.*, 1998).

In den NMR Spektren von Proguanylin wurde entsprechend einer einheitlichen Hormontopologie für die Reste Gly81 bis Cys94 nur ein einziger Satz an Spinsystemen mit zum A-Isomer ähnlichen sekundären chemischen Verschiebungen identifiziert (Kapitel 5.1.5.3, Abb. 5.20). Im Guanylin-Prohormon tritt die für das isolierte Peptid beobachtete topologische Isomerie daher nicht auf. Dementsprechend wurde in der auf Basis der NMR-Parameter berechneten dreidimensionalen Struktur von Proguanylin ausschließlich die biologisch aktive Topologie für die Hormonregion gefunden (Kapitel 5.1.5.7, Abb. 5.28; Abb. 6.1).

Diese A-Form ähnliche Topologie wird durch zahlreiche Wechselwirkungen mit dem NH_2 -terminalen Faltblattstrang stabilisiert, indem sich die beiden Bereiche wie zwei ineinander verhakte Hände gegenseitig umfassen (Abb. 6.1).

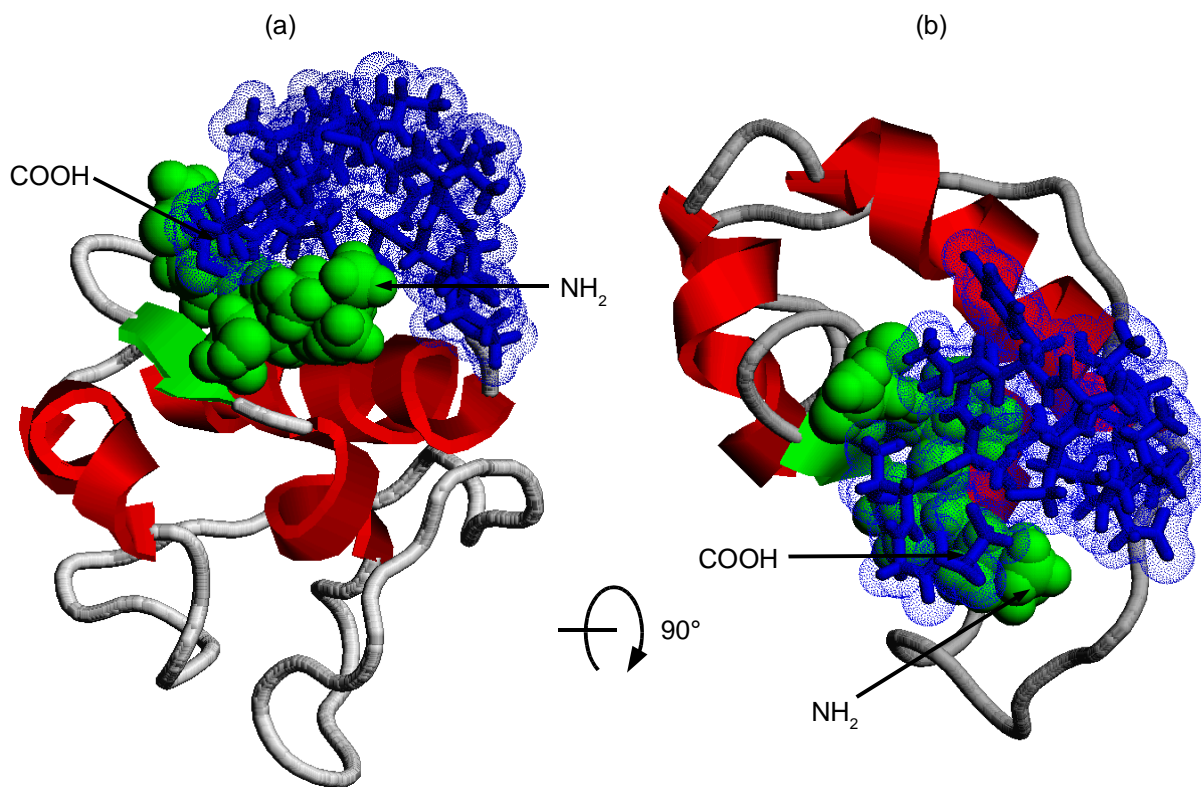


Abbildung 6.1: Darstellung der Wechselwirkungen zwischen der Hormonregion und dem NH_2 -Terminus in der Proguanylin-Struktur. Gezeigt ist die schematische Darstellung einer repräsentativen Struktur, wobei helikale Elemente in rot, die Faltblattstränge 1 und 2 in grün und die Hormonregion (Pro80 bis Cys94) in blau wiedergegeben sind. Die Reste Val1 bis Gln4 sind raumfüllend dargestellt, während für die Reste 80-94 die raumfüllende Darstellung angedeutet ist. Im Vergleich mit der in Abb. 5.28 gezeigten Orientierung ist die Struktur in (a) um 45° um eine vertikale Achse gedreht. (b) Durch 90°-Drehung um eine horizontale Achse aus (a) erhaltene Orientierung.

Neben den Faltblatt-typischen Wechselwirkungen zwischen den Rückgrat- und Seitenkettenatomen von Cys91 und Thr92 mit denen von Thr2, Val3 und Gln4 kommt es dabei zu weiteren Kontakten zwischen den Rückgrat- und Seitenkettenatomen bzw. zwischen den Seitenketten der beiden Bereiche. Wie aus den beobachteten NOE-Kreuzresonanzen hervorgeht, sind an diesen Wechselwirkungen vor allem die Reste Val1 bis Gln4, Cys86 und Ala90 bis Cys94 beteiligt. Die Seitenketten von Val1 und Val3 kommen bei dieser Anordnung unter der durch die Disulfidbrücken (Cys83 – Cys91/Cys86 – Cys94) aufgespannten Ebene zu liegen und beeinflussen die relative Lage der topologiebestimmenden Schleife (Ala87-Ala90; Abb. 6.1). Bei konservierter Topologie der Prosequenz würde eine B-Form ähnliche Struktur der Hormonregion zu sterisch ungünstigen Kontakten führen. Daher scheinen die Wechselwirkungen zwischen den Termini zusammen mit der Struktur der Prosequenz für eine Stabilisierung der Guanylin A-Form im Prohormon ausreichend zu sein (Lauber *et al.*, 2003). Unterstützt wird diese Annahme durch Strukturberechnungen, bei denen als hypothetische Randbedingungen keine die Hormontopologie bestimmenden, mittelweitreichenden Distanzbeschränkungen verwendet wurden (Daten nicht gezeigt). In diesem Fall waren bereits die tertiären Kontakte zwischen den Termini für eine eindeutige Stabilisierung des A-Isomers ausreichend.

6.1.3.4 Mögliche Ursachen für die fehlende biologische Aktivität von Proguanylin

Abschirmung der Hormonregion durch den NH₂-Terminus

Obwohl in der Proguanylin-Struktur die Reste Pro80 bis Cys94 in der biologisch aktiven Topologie des A-Isomers vorliegen, kommt es nur zu einer vernachlässigbar geringen Aktivierung der GC-C durch das Prohormon (Kapitel 1.5.1, 5.1.4.4, Abb. 5.9; Schulz *et al.*, 1999). Diese fehlende Aktivität von Proguanylin wird auf eine gegenüber dem isolierten Hormon deutliche verringerte Rezeptorbindungsfähigkeit zurückgeführt (Garcia *et al.*, 1993). Die im vorherigen Abschnitt erläuterten Wechselwirkungen zwischen den NH₂-terminalen Aminosäuren und der Hormonregion (Abb. 6.1) bewirken eine Abschirmung von Teilen der im freien Hormon zugänglichen Oberfläche und können somit die beobachtete, deutlich verringerte Affinität von Proguanylin gegenüber der GC-C erklären (Lauber *et al.*, 2003).

Abschirmung von Tyr88 durch Arg72

Aus Alanin-*scan*-Experimenten mit synthetischem Guanylin ist bekannt, daß die Seitenkette von Tyr88 eine essentielle Funktion bei der Rezeptorbindung und -aktivierung besitzt (Schulz, 2000). Die Einbeziehung von Tyr88 in tertiäre Kontakte im Prohormon sollte daher über eine eingeschränkte Zugänglichkeit dieser Aminosäure zusätzlich zu einer verringerten Affinität gegenüber der GC-C führen. Eine genauere Betrachtung der NMR Spektren legt für eine derartige Wechselwirkung Kontakte von Tyr88 zu Arg72 nahe.

Für die Seitenkette von Arg72 werden in den NMR Spektren von Proguanylin als sehr auffällige chemische Verschiebungen eine ausgeprägte magnetische Entschirmung des H ϵ Spins (H ϵ = 9,99 ppm; vgl. Kapitel 5.1.5.1, Abb. 5.18), beobachtbare H η Verschiebungen (H η = 6.77 ppm; N η = 100.07 ppm) und aufgelöste H δ Protonen (H δ 2 = 3.52 ppm, H δ 3 = 3.12 ppm) beobachtet. Diese Werte entsprechen einer fast zweifachen Standardabweichung vom Durchschnitt für den H δ 2 Spin (3.13 ± 0.23 ppm; <http://www.bmrb.wisc.edu>), sowie einer mehr als fünffachen Standardabweichung für das H ϵ Proton (H ϵ = $7,32 \pm 0,52$ ppm) und sprechen für eine definierte und fixierte Konformation der Seitenkette von Arg72 in der Proguanylin-Struktur. Ein Vergleich mit den in der BioMagnResBank (<http://www.bmrb.wisc.edu>) und PDB (<http://www.rcsb.org/pdb/>) hinterlegten Daten zeigt, daß Werte von Arginin-H ϵ Protonen größer als 9 ppm in 80 % der Fälle durch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen der jeweiligen Guanidinium-Gruppierung der Argininseitenkette und der Carboxylgruppe eines Glutamat- oder Aspartatrestes verursacht werden. Bei den übrigen 20 % ist die entsprechende Argininseitenkette in Kationen- π -Wechselwirkungen mit Tyrosin oder Tryptophan einbezogen.

Im Fall von Proguanylin sollten aufgrund der räumlichen Nähe von Arg72 und den Glutamatresten 68 und 75 prinzipiell elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den genannten Aminosäuren möglich sein. Dennoch scheinen für die auffälligen chemischen Verschiebungen von Arg72 Wechselwirkungen mit der Seitenkette von Tyr88 verantwortlich zu sein, obwohl in den NMR Spektren von Proguanylin nur schwache und frequenzdegenerierte NOE-Kreuzresonanzen zwischen Arg72 H δ und den H ϵ Protonen von Tyr88 beobachtet werden. Ein eindeutiger Hinweis auf eine Wechselwirkung zwischen der genannten Arginin- und Tyrosinseitenkette wird jedoch aus der Analyse der Spektren von Proguanylin-C86S/C94S erhalten. Bei dieser Mutante war vor allem die Hormonregion von strukturellen Veränderungen betroffen (Kapitel 5.2.5.2, Abb. 5.43, 5.44), während die übrige Struktur,

einschließlich der dritten, Arg72 enthaltenden Helix (Ala66-Glu78; Kapitel 5.2.5.2, Abb. 5.44) praktisch unbeeinflusst war. In diesem Fall wurde die durch die Mutation veränderte Konformation von Tyr88 von einem Verlust der ausgeprägten H ϵ Verschiebung von Arg72 begleitet (Kapitel 5.2.5.2, Abb. 5.43). Da die Amidprotonenverschiebungen der für eine potentielle Salzbrücke mit Arg72 in Frage kommenden Aminosäuren Glu68 und Glu75 praktisch nicht von der Mutation beeinflusst wurden (Abb. 5.43), weisen die NMR Spektren von Proguanylin-C86S/C94S auf eine Wechselwirkung zwischen Arg72 und Tyr88 hin.

Wie bereits erwähnt wurden ausschließlich schwache und frequenzdegenerierte NOE-Kreuzresonanzen zwischen den Seitenketten von Arg72 und Tyr88 beobachtet, die bei der Berechnung der dreidimensionalen Struktur von Proguanylin nicht berücksichtigt wurden. Dementsprechend sind die Orientierungen dieser Seitenketten aufgrund der relativ geringen Anzahl an experimentellen Randbedingungen etwas schlechter als die benachbarten Reste definiert (Kapitel 5.1.5.6, Abb. 5.26). In 10 % der akzeptierten Strukturen findet man dennoch Abstände kleiner als 6 Å zwischen den Arg72 H δ 2 und Tyr88 H ϵ Protonen und eine explizite Berücksichtigung der beschriebenen Wechselwirkung bei der Strukturberechnung beeinflusst weder die Geometrie noch die Gesamtenergie der resultierenden Strukturen (Daten nicht gezeigt).

Auch sterische Einflüsse könnten einen Beitrag zur fehlenden Aktivität leisten

Bei einem Vergleich der biologischen Aktivitäten und Bindungseigenschaften der bislang publizierten Proguanylin-Fragmente müssen neben den bisher genannten Möglichkeiten für die fehlende Aktivität von Proguanylin weitere Gründe in Betracht gezogen werden. So ist das 32 Aminosäuren umfassende Proguanylin-Fragment von Glu63 bis Cys94 zwar in der Lage mit einer mit dem biologisch aktiven Fragment Leu73-Cys94 (22 Aminosäuren) übereinstimmenden Affinität an die GC-C zu binden (Garcia *et al.*, 1993), jedoch ohne eine Aktivierung zu bewirken (Schulz *et al.*, 1999).

Durch das Fehlen der beschriebenen intramolekularen, abschirmenden Wechselwirkungen zwischen den Termini (Abb. 6.1) kann aus der Proguanylin-Struktur für das NH₂-terminal verkürzte Fragment Glu63-Cys94 eine erhöhte Flexibilität der ursprünglich im Prohormon fixierten Hormonregion abgeleitet werden, die auch eine Aufhebung der Wechselwirkung zwischen Tyr88 und Arg72 durch die Bildung der topologischen Isomere nahelegt. Die beobachtete Bindungsfähigkeit dieses Fragments erscheint daher plausibel. Da die

Rezeptorbindung dennoch nicht zur Aktivierung der GC-C führt, müssen weitere Ursachen für die fehlende biologische Aktivität von Glu63-Cys94 in Betracht gezogen werden, die vermutlich auf die gegenüber dem aktiven Fragment Leu73-Cys94 zusätzlichen 10 NH₂-terminalen Aminosäuren zurückzuführen sind. Denkbare Ursachen sind zum Beispiel die sterischen Eigenschaften des Guanylin/GC-C-Komplexes oder mögliche für die Rezeptoraktivierung notwendige Konformationsänderungen. So wird beispielsweise die Ligandenbindungsstelle des GC-C-homologen Rezeptors NPR-C durch die beiden monomeren Hälften des dimeren Rezeptors gebildet, und die Bindung der natriuretischen Peptide führt zu einer für die Rezeptoraktivierung essentiellen Konformationsänderung (Kapitel 6.2.3; He *et al.*, 2001). Überträgt man diese Situation auf die GC-C, die wie der NPR-C schon vor Ligandenbindung als Oligomer in der Membran vorliegt (Kapitel 1.6.1), könnten die für die Aktivierung notwendigen konformationellen Änderungen durch die Größe der Liganden beeinflusst werden (Lauber *et al.*, 2003). Weitere eindeutige Belege für diese Hypothese erfordern jedoch die Bestimmung der dreidimensionalen Struktur des Komplexes aus GC-C und einem der Liganden Guanylin, Uroguanylin oder STa.

6.1.3.5 Analyse möglicher Proteinase-Erkennungsstellen für die Prozessierung von Proguanylin

Das biologisch aktive Peptidhormon Guanylin kann durch saure Hydrolyse der labilen Asp79-Pro80-Bindung aus Proguanylin freigesetzt werden (Kapitel 5.1.4.3; Schulz *et al.*, 1999). Dieser Prozess ist vermutlich bereits bei der ursprünglichen sauren Isolierung von Guanylin aus dem Dünndarm von Ratten aufgetreten (Kapitel 1.5.1; Currie *et al.*, 1992; Schulz *et al.*, 1999), so daß über eine *in vivo* relevante proteolytische Prozessierung von Proguanylin noch immer nichts bekannt ist.

Bislang konnte noch keine Proteinase mit einer Asp-Pro-Spezifität identifiziert werden, so daß trotz der exponierten Lage der Asp79-Pro80-Bindung in der Proguanylin-Struktur (Kapitel 5.1.5.7, Abb. 5.28) eine proteolytische Prozessierung an dieser Position unwahrscheinlich ist. Da der Verdau von Proguanylin mit Trypsin unter anderem zur Bildung des COOH-terminalen Fragments Leu73-Cys94 führt, welches die gleiche biologische Aktivität wie das ursprünglich isolierte Fragment Pro80-Cys94 besitzt (de Sauvage *et al.*, 1992), scheint eine Prozessierung von Proguanylin durch Trypsin plausibel zu sein. Die entsprechende Trypsin-Erkennungssequenz (Arg72-Leu73) ist an der Außenseite von Helix 3

lokalisiert und teilweise für das Lösungsmittel zugänglich. Zusammen mit der gewebe-spezifischen Expression in den Paneth-Zellen des Dünndarms (de Sauvage *et al.*, 1992) legt die Proguanylin-Struktur daher einen Trypsin-Verdau an dieser Sequenzposition nahe (Lauber *et al.*, 2003).

6.1.3.6 Die Proguanylin-Struktur stellt einen neuen Proteinfaltungstyp dar

Bislang wurden nur sehr wenige Arbeiten über Prohormone publiziert, von denen lediglich die Strukturen unterschiedlicher Mutanten von Mini-Proinsulin in der Proteinstruktur-Datenbank PDB hinterlegt sind (PDB Einträge 1efe; 1syt; 1sju). Da man bei der Suche nach homologen Proteinen ausschließlich die Prohormone von Guanylin und Uroguanylin der unterschiedlichen Organismen findet, für die bislang keine dreidimensionalen Strukturen bekannt waren, und auch Programme zur sequenzbasierten Faltungsvorhersage, wie 3D-PSSM (Kelley *et al.*, 2000), keine möglicherweise strukturell verwandten Proteine mit ausreichender Zuverlässigkeit identifizieren konnten, lagen bereits vor der Strukturbestimmung von Proguanylin Hinweise auf einen bislang unbekannten Faltungstyp vor. Mit Hilfe des DALI Servers (Holm & Sander, 1993; <http://www2.ebi.ac.uk/dali/>) wurde die experimentell bestimmte Proguanylin-Struktur schließlich mit allen in der PDB hinterlegten Strukturen verglichen, ohne jedoch auf eine Struktur mit einer ähnlichen Faltungstopologie zu stoßen. Die in dieser Arbeit bestimmte Struktur des humanen Prohormons Proguanylin repräsentiert daher einen neuen Proteinfaltungstyp (Lauber *et al.*, 2003).

6.1.3.7 Für das verwandte Uroguanylin-Prohormon kann eine Proguanylin-homologe Faltung angenommen werden

Bei einem Vergleich der Aminosäuresequenzen von Proguanylin und Prouroguanylin war neben einer Identität von 35 % als Hauptunterschied eine Deletion in der unstrukturierten Region von Proguanylin aufgefallen (Kapitel 5.2.3, Abb. 5.31). Durch die Untersuchung einer entsprechenden Mutante (Proguanylin- $\Delta(28-37)$, Kapitel 5.2.3) konnte ein Einfluß dieses flexiblen Bereiches auf den Assoziationsgrad und die dreidimensionale Struktur von Proguanylin ausgeschlossen werden, so daß auch für das Uroguanylin-Prohormon ein monomerer Zustand in Lösung angenommen werden kann (Kapitel 6.1.2.2). Da weiterhin die für Prouroguanylin vorhergesagte Sekundärstruktur im Wesentlichen der experimentell bestimmten von Proguanylin entspricht (Abb. 5.31), können für beide Proteine auch

übereinstimmende dreidimensionale Strukturen angenommen werden. Daher wurde auf der Basis einer repräsentativen Proguanylin-Struktur mit den Programmen von Guex und Peitsch (1997) ein Strukturmodell von Prouroguanylin erstellt (Abb. 6.2).

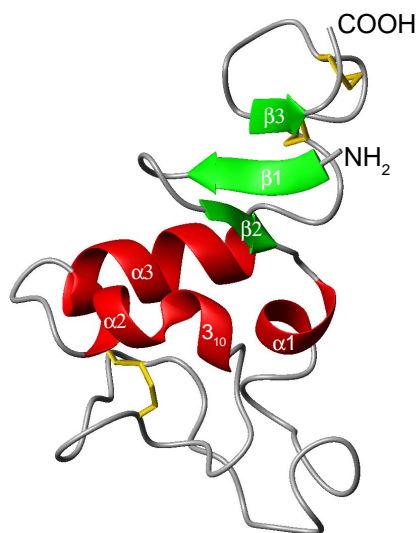


Abbildung 6.2: Schematische Darstellung des Strukturmodells von Prouroguanylin. Helikale Elemente sind in rot, die Faltblattstränge in grün und die disulfidverbrückten Cysteinreste (41 – 54, 74 – 82, 77 – 85) sind in gelb dargestellt.

Die genannten Kriterien für die Molekülmodellierung von Prouroguanylin werden zusätzlich durch die biochemischen Eigenschaften dieses Proteins unterstützt, die große Parallelen zu Proguanylin aufweisen (Kapitel 1.5): So wird neben analogen Funktionen und homologen dreidimensionalen Strukturen (Guanylin: PDB Eintrag 1gna, 1gnb; Uroguanylin: PDB Eintrag 1uya, 1uyb) für die Peptidhormone Guanylin und Uroguanylin ein ähnliches Gleichgewicht zwischen zwei topologischen Isomeren beobachtet (Skelton *et al.*, 1994; Marx *et al.*, 1998). Weiterhin sind die Prosequenzen beider Hormone, insbesondere die NH_2 -terminalen Bereiche, *in vitro* für die Ausbildung der für die biologische Aktivität benötigten Disulfidbrücken essentiell (Hidaka *et al.*, 1998; Schulz *et al.*, 1999; Hidaka *et al.*, 2000). Da Hidaka *et al.* (1998) für die Hormonregion von Prouroguanylin die ebenfalls bei Proguanylin vorliegende A-Topologie nachweisen konnten (vgl. Kapitel 1.5.4, 5.1.5.7, Abb. 5.28), können auch für das Uroguanylin-Prohormon Proguanylin-ähnliche Wechselwirkungen mit der eigenen Prosequenz (Kapitel 6.1.3.3, Abb. 6.1) erwartet werden (Lauber *et al.*, 2003).

Das Modell kann jedoch trotz der gleichen Anordnung und Orientierung der Sekundärstrukturelemente keine Information über die Topologie der unstrukturierten Region liefern. Dennoch bestätigt die Modellstruktur von Prouroguanylin (Abb. 6.2), daß eine Deletion im zentralen Sequenzabschnitt von Proguanylin prinzipiell erfüllt werden kann und somit indirekt die aus der NMR-spektroskopischen Analyse von Proguanylin- $\Delta(28-37)$ vorausgesagten strukturellen Veränderungen (Kapitel 5.2.3.3, Abb. 5.36 und 5.37).

6.2 Die extrazelluläre Domäne der Guanylatzyklase-C

6.2.1 Die Strukturmodelle von miniGC-C und GC-C_{ECD}

Um die Wechselwirkung zwischen der extrazellulären Domäne der GC-C und deren Liganden Guanylin, Uroguanylin und STa auf molekularer Ebene mittels NMR Spektroskopie untersuchen zu können, sollte im Rahmen dieser Arbeit ein lösliches, strukturiertes und zur Ligandenbindung fähiges Fragment der GC-C_{ECD} entwickelt werden. Dazu wurde zunächst ein Strukturmodell der gesamten GC-C_{ECD} auf der Basis der Kristallstruktur der löslichen extrazellulären Domäne des homologen ANP-Rezeptors erstellt (Kapitel 5.3.1). Später konnte dann gezeigt werden, daß die schließlich aus dem GC-C_{ECD}-Modell abgeleitete proximale Domäne (miniGC-C; Kapitel 5.3.2) ein lösliches, strukturiertes Protein ist (Tidten, 2003), das mit 195 Aminosäuren im für die NMR Spektroskopie zugänglichen Größenbereich liegt. Zusammen mit der für dieses Fragment nachgewiesenen hohen Affinität bezüglich des GC-C-Liganden STp-(5-17) ($K_D = 13 \pm 7$ nM; Kapitel 5.3.2.4, Abb. 5.51; Tidten, 2003) bestätigten diese Daten das miniGC-C-Modell und somit indirekt die trotz der geringen Sequenzidentität von nur 19 % zum ANP-Rezeptor hohe Aussagekraft des Strukturmodells der gesamten extrazellulären Domäne.

Aufgrund der für die Ausbildung der nativen Disulfidverbrückung essentiellen Prosequenzen der endogenen GC-C-Liganden Guanylin und Uroguanylin (Kapitel 6.1.3.1), sind diese neben der Gewinnung aus dem entsprechenden Prohormon nur über chemische Synthese mit selektiver Einführung der Disulfidbrücken zugänglich. Daher stellt das in dieser Arbeit entwickelte Expressions- und Reinigungssystem zur Gewinnung von rekombinantem Proguanylin (Kapitel 5.1.3, 6.1.1) gleichzeitig die Grundlage für die Herstellung von homogen ¹⁵N und ¹³C/¹⁵N markiertem Guanylin dar und liefert somit eine weitere Voraussetzung für zukünftige strukturelle Untersuchungen der Wechselwirkungen zwischen miniGC-C bzw. der gesamten GC-C_{ECD} und deren Liganden.

6.2.2 Die Guanylin/GC-C-Wechselwirkung

Die Kartierung aller die Ligandenbindung bzw. Rezeptoraktivierung beeinflussenden Mutations- und *Crosslink*-Daten (Wada *et al.*, 1996a; Hasegawa *et al.*, 1999b) auf der Modellstruktur der GC-C_{ECD} ermöglicht eine Einschränkung der Ligandenbindungsregion (Abb. 6.3 (a)). Dabei entsprechen die wesentlichen, an der Bindung der Liganden beteiligten Reste dem mittels *Crosslinking* und gerichteter Mutagenese identifizierten Abschnitt von

Ser387 bis Lys393 (Abb. 6.3, (a), blauer Bereich), der direkt an den COOH-terminalen Faltblattstrang anschließt. Diese Region liegt im Strukturmodell der GC-C_{ECD} aufgrund der bei der Molekülmodellierung verwendeten Matrize zwar unstrukturiert vor, für die Positionen Phe390 und Ile391 wird jedoch ein weiterer Faltblattstrang vorhergesagt (Jones, 1999).

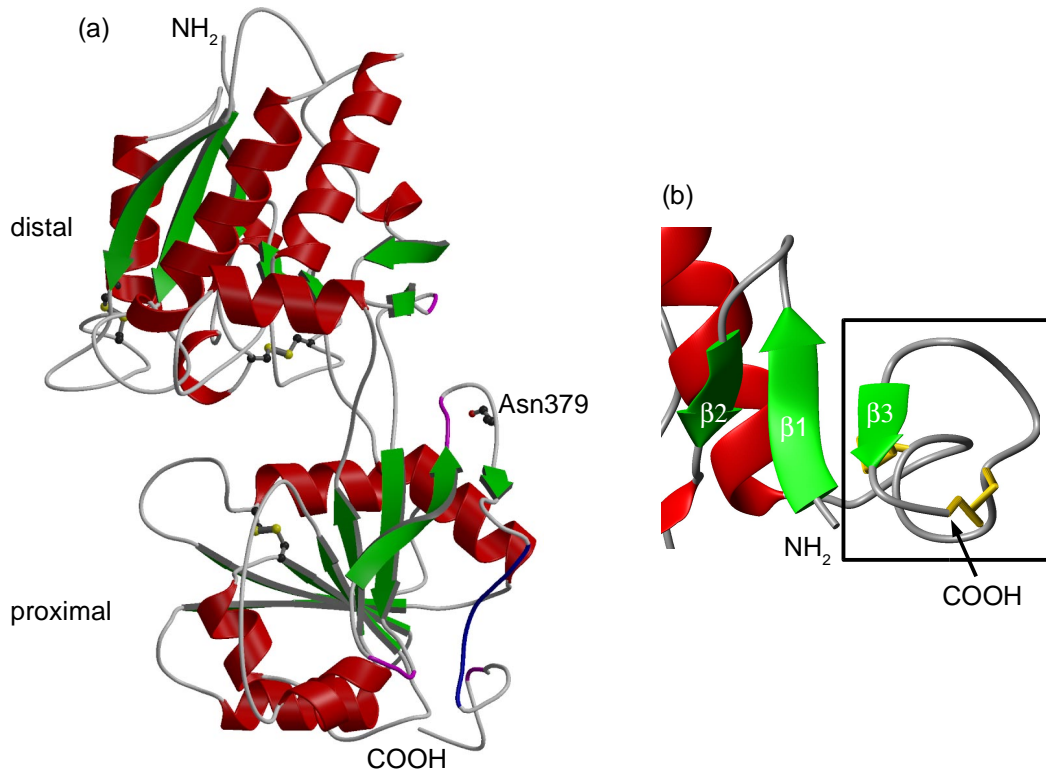


Abbildung 6.3: (a) Schematische Darstellung der Modellstruktur der GC-C_{ECD}. Aus Mutationsdaten bekannte Sequenzpositionen, die einen Einfluß auf die Ligandenbindung bzw. Rezeptoraktivierung besitzen (nach Wada *et al.*, 1996a), sind in violett dargestellt, durch *Crosslinking* und gerichtete Mutagenese identifizierte (Hasegawa *et al.*, 1999b), unmittelbar an der Ligandenbindung beteiligte Positionen sind blau gefärbt. Die als Stäbchenmodell gezeigte Seitenkette von Asn379 entspricht einer für die Rezeptoraktivierung essentiellen Glykosylierungsstelle (Hasegawa *et al.*, 1999c). (b) Ausschnitt aus der Proguanylin-Struktur, der die Bindung der Hormonregion (eingerahmt) an den NH₂-terminalen Faltblattstrang zeigt.

Da die Hormonregion von Proguanylin in der Lage ist, an den NH₂-terminalen β-Faltblattstrang der Prohormon-Struktur zu binden (Abb. 6.3, (b)), und die Ligandenbindungsregion der GC-C in der direkten Umgebung eines exponierten und zugänglichen Faltblattstrangs liegt, ist ein mit dem Prohormon ähnliches Interaktionsmotiv zwischen Guanylin und der GC-C naheliegend. Wie aus dem Vergleich von Proguanylin mit Proguanylin-C86S/C94S hervorging (Kapitel 6.1.3.1), kommt es erst durch die Wechselwirkung mit der Hormonregion zur Stabilisierung des NH₂-terminalen Faltblatt-

strangs. Bei ähnlichen Kontakten zwischen Guanylin und der GC-C_{ECD} könnte daher erst die Ligandenbindung zur Induktion eines intermolekularen Faltblattes führen, an dem ein Strang von Guanylin und ein zweiter der GC-C_{ECD} beteiligt ist.

6.2.3 Die Aktivierung der GC-C

Weitere, die Ligandenbindung und Rezeptoraktivierung beeinflussende Mutationen waren immer Doppelmutationen (Abb. 6.3, violette Bereiche; Wada *et al.*, 1996a), so daß deren Interpretation nicht ohne weiteres möglich ist und eventuelle Einflüsse auf die Struktur der gesamten extrazellulären Domäne nicht ausgeschlossen werden können. Dennoch fällt auf, daß alle Mutationen in dem von Hidaka *et al.* (2002) als Microdomäne bezeichneten Sequenzabschnitt zu finden sind (vgl. Kapitel 5.3.1, Abb. 5.45) und neben der proximalen auch zwei Reste der distalen Subdomäne betreffen (Abb. 6.3, (a)).

Für die strukturell homologen extrazellulären Ligandenbindungsdomänen der Rezeptoren mGluR (metabotropher Glutamaterezeptor; PDB Eintrag 1ewk) und NPR-C (Kapitel 5.3.1) wird bei Ligandenbindung eine Bewegung der beiden Subdomänen relativ zueinander beobachtet, die schließlich zur Aktivierung führt (Armstrong *et al.*, 1998; Kunishima *et al.*, 2000; He *et al.*, 2001). Dabei fungiert die flexible Verbindungsregion der beiden Subdomänen (Kapitel 5.3.1) als Scharnier (Abb. 6.4). In den Fällen des NPR-C und der GC-C sind außerdem N-Glykane an der Stabilisierung der Strukturen der extrazellulären Domänen beteiligt (Hasegawa *et al.*, 1999c; He *et al.*, 2001), welche jedoch keine direkten Wechselwirkungen mit den Liganden einzugehen scheinen und an ähnlichen Positionen in den Strukturen lokalisiert sind (Abb. 6.4, (b); Abb. 6.3, (a), Asn379). Bei dem NPR-C ist dieses Glykan an einem zwischen proximaler und distaler Subdomäne ausgebildeten Wasserstoffbrücken-Netzwerk beteiligt, das die inaktive Konformation dieses Rezeptors stabilisiert (Abb. 6.4, (b); He *et al.*, 2001). Daher können die die Aktivierungsfähigkeit der GC-C beeinflussenden Mutationen in der Spalte zwischen den beiden Subdomänen der GC-C_{ECD} (Abb. 6.3, (a)) als Hinweise auf über die Glykosylierung vermittelte Domänenkontakte und eine NPR-C-analoge Domänenbewegung bei Rezeptoraktivierung angesehen werden.

Wie aus dem Vergleich unterschiedlicher Proteine mit PBP-Faltung vom Typ I hervorgeht (vgl. z.B. Abb. 6.4 und 6.3, (a)), ist die Lokalisation der Ligandenbindungsregion äußerst divergent, so daß weitere Aussagen über einen genauen Mechanismus der Aktivierung der GC-C auf Basis des erstellten Strukturmodells nicht möglich sind.

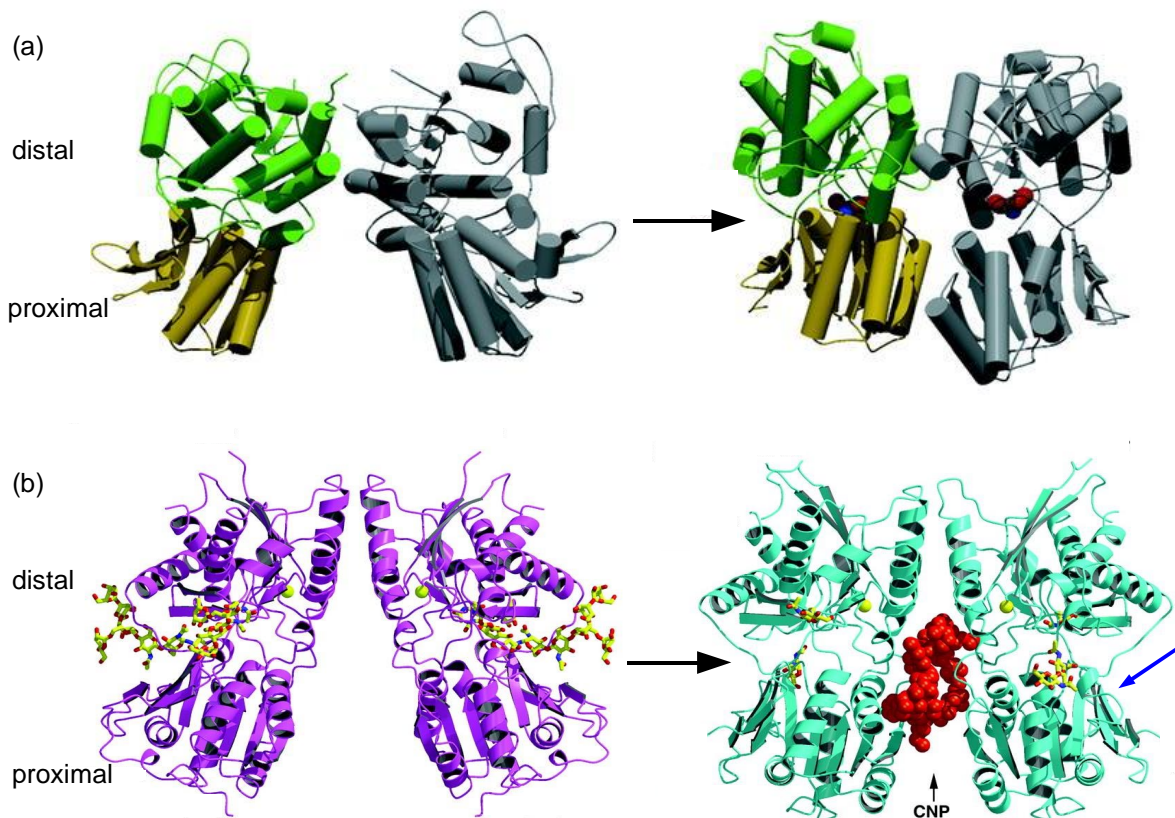


Abbildung 6.4: Ligandeninduzierte Konformationsänderungen der extrazellulären Domänen des metabotropen Glutamatrezeptors (a) (nach: van den Akker, 2001) und des NPR-C (b) (nach: He *et al.*, 2001). Die schematischen Darstellungen der dimeren Rezeptoren sind jeweils ohne (links) und mit (rechts) gebundenem Liganden gezeigt. Beim NPR-C führt die Ligandenbindung zu einer Bewegung der proximalen Subdomänen aufeinander zu, wodurch sich deren Abstand um 20 Å verkürzt (He *et al.*, 2001). (a) Ligand: Kainat (rot/blau). Distale (grün) und proximale (gelb) Subdomäne eines Monomers sind farblich hervorgehoben. (b) Ligand: CNP (C-type natriuretic peptide; rot). Das in der Liganden-freien Konformation stabilisierend wirkende N-Glykan ist als gelb/rotes Stäbchenmodell und ein fest gebundenes Chloridion ist als gelbe Kugel dargestellt. Die entsprechende Ligandenbindungsregion der GC-C ist durch einen blauen Pfeil gekennzeichnet.

Die aus der Analyse der Modellstruktur der GC-C_{ECD} und dem Vergleich mit Rezeptoren homologer Faltung gewonnenen Erkenntnisse zeigen, daß miniGC-C durch das Fehlen der distalen Subdomäne zwar nicht für Studien der für die GC-C-Aktivierung erforderlichen Konformationsänderungen, jedoch für die Untersuchung der Rezeptor-Liganden-Wechselwirkung geeignet ist. Dieser Befund wird durch die nachgewiesene Ligandenbindungsfähigkeit von miniGC-C bestätigt.

7. Zusammenfassung

Die Peptidhormone Guanylin und Uroguanylin sind als spezifische Liganden der intestinalen membrangebundenen Guanylatzyklase-C entscheidend an der Regulation des Flüssigkeits- und Elektrolythaushaltes im Darm beteiligt. Obwohl die Rolle dieses (Uro)Guanylin/Guanylatzyklase-C Systems bei der durch die hitzestabilen bakteriellen Enterotoxine vermittelten Diarrhöe schon lange bekannt ist, gibt es bis heute nur sehr wenige Informationen über molekulare und strukturelle Details der Vorläuferproteine der Liganden, der GC-C_{ECD} und der Liganden/Rezeptor-Wechselwirkung. Um zum Verständnis der biochemischen Eigenschaften des Guanylin-Prohormons beizutragen sowie den Einfluß der Prosequenz auf die Ausbildung der für die biologische Aktivität von Guanylin essentiellen Disulfidbrücken zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Arbeit daher die Struktur von humanem Proguanylin bestimmt. Des Weiteren wurde als Grundlage für weiterführende NMR-spektroskopische Untersuchungen der Guanylin/GC-C-Wechselwirkung ein geeignetes Fragment der extrazellulären Domäne dieses Rezeptors konstruiert.

Um die Strukturbestimmung von Proguanylin zu ermöglichen, wurde zunächst ein effizientes Expressions- und Reinigungsprotokoll für dieses Protein entwickelt, das es erlaubte, Proguanylin mit der nativen Disulfidverbrückung und natürlichen biologischen Aktivität in löslicher Form zu gewinnen. Durch den Vergleich mit dem natürlichen, aus menschlichem Hämofiltrat isolierten Prohormon wurden für beide Proteine übereinstimmende biophysikalische Eigenschaften und dreidimensionale Strukturen nachgewiesen. Des Weiteren wurde mittels analytischer Sedimentationsexperimente für beide Proteine eindeutig ein monomerer Assoziationsgrad in Lösung auch bei millimolaren Konzentrationen nachgewiesen und dadurch ein früher postulierter dimerer Zustand widerlegt (Lauber *et al.*, 2002). Die anschließende Berechnung der dreidimensionalen Struktur von Proguanylin erfolgte durch die Verwendung von 700 aus den NMR Spektren des homogen ¹⁵N und ¹³C/¹⁵N markierten rekombinanten sowie des natürlichen Proteins abgeleiteten experimentellen Randbedingungen. Die Struktur von Proguanylin in Lösung stellt einen neuen Proteinfaltungstyp dar und weist drei zu einem Bündel zusammengelagerte α -Helices, ein kurzes, dreisträngiges, antiparalleles β -Faltblatt sowie einen 23 Aminosäuren umfassenden unstrukturierten Bereich auf. Da das Faltblatt durch zwei NH₂-terminale und einen COOH-terminalen Strang gebildet wird, kommt es zu einer unmittelbaren Nachbarschaft der Termini. Dabei wird die Hormonregion (Reste 80-94) von Proguanylin unter anderem durch die

Wechselwirkungen mit dem NH₂-terminalen Faltblattstrang in einer Guanylin A-Isomer ähnlichen Topologie stabilisiert. Diese Kontakte bewirken außerdem eine teilweise Abschirmung der ansonsten im freien Hormon zugänglichen Oberfläche und können daher die äußerst geringe Affinität bezüglich der GC-C und die damit verbundene vernachlässigbare Aktivität von Proguanylin erklären (Lauber *et al.*, 2003). Eine beobachtete Wechselwirkung zwischen der für die biologische Aktivität von Guanylin essentiellen Seitenkette von Tyr88 mit Arg72 leistet einen zusätzlichen Beitrag zur Inaktivierung der Hormonregion. Die Wechselwirkungen zwischen den terminalen Bereichen in der Proguanylin-Struktur scheinen außerdem für die Ausbildung der nativen Disulfidverbrückung essentiell zu sein (Lauber *et al.*, 2003). Eine Bestätigung dieser Annahmen wurde aus der Analyse von Proguanylin-Mutanten (Proguanylin-C48S/C61S und Proguanylin-C86S/C94S) erhalten, die eine strukturstabilisierende Funktion der Disulfidbrücke Cys48 – Cys61 nahelegt und für einen direkten Einfluß der Prosequenz auf die Struktur der Hormonregion spricht. Weiterhin konnte für das homologe Uroguanylin-Prohormon auf der Basis einer Proguanylin-Deletionsmutante ein Strukturmodell erstellt werden.

Für die extrazelluläre Domäne der GC-C wurde basierend auf der Kristallstruktur der Ligandenbindungsdomäne des homologen ANP-Rezeptors ein Strukturmodell erstellt. Mit dessen Hilfe konnte die Ligandenbindungsregion auf die direkte Umgebung eines exponierten und zugänglichen Faltblattstrangs kartiert werden. Daher wurde für die Wechselwirkung zwischen Guanylin und der GC-C_{ECD} ein zu den intramolekularen Kontakten zwischen Guanylin und der Prosequenz ähnliches Interaktionsmotiv postuliert. Aufgrund der Größe und des Oligomerezustandes ist die GC-C_{ECD} nicht für NMR-spektroskopische Untersuchungen zur detaillierten Charakterisierung der Wechselwirkung dieses Rezeptors mit seinen Liganden geeignet. Daher wurde ein kleineres, lösliches, strukturiertes und zur Ligandenbindung fähiges Rezeptorfragment benötigt, das in Form der als miniGC-C bezeichneten membrannahen Subdomäne der GC-C_{ECD} konstruiert wurde. Dieses Fragment erfüllt die gewünschten Anforderungen und ist in der Lage, den Liganden STp-(5-17) mit einer hohen Affinität zu binden ($K_D = 13 \pm 7$ nM; Tidten, 2003). Zur Untersuchung des zugehörigen Komplexes stellt das entwickelte Expressions- und Reinigungssystem zur Gewinnung von rekombinantem Proguanylin gleichzeitig die Grundlage für die Herstellung von homogen ¹⁵N und ¹³C/¹⁵N markiertem Guanylin dar, welches für zukünftige NMR-spektroskopische Untersuchungen der Wechselwirkungen zwischen Guanylin und der GC-C benötigt wird.

8. Summary

The peptide hormones guanylin and uroguanylin are involved in regulation of intestinal fluid and electrolyte secretion by specifically activating the receptor guanylyl cyclase C. Due to its correlation with the severe secretory diarrhea caused by bacterial heat stable enterotoxins this (uro)guanylin/guanylyl cyclase C system is well known. However, only few structural and detailed molecular information about the precursor proteins of the endogenous ligands of GC-C, about the extracellular ligand binding domain of this receptor, and the ligand/receptor interaction is available so far. In order to contribute to the understanding of the biochemical properties of the guanylin prohormone, as well as to analyse the influence of the prosequence upon formation of the disulfide bonds essential for the hormone's bioactivity the present work therefore focussed on structure determination of proguanylin. Furthermore, a fragment of the extracellular domain of GC-C was designed, that is suitable for further structural studies of the guanylin/receptor interaction using NMR spectroscopy.

To allow structure determination of the human prohormon proguanylin, an efficient system for the recombinant expression and purification of this protein with its native disulfide connectivity and biological activity was established. The comparison of recombinant with natural proguanylin isolated from human blood ultrafiltrate revealed identical biophysical properties and threedimensional structures for both proteins. Exhaustive analytical ultracentrifugation studies were employed for protein concentrations up to the millimolar range to determine the association state of recombinant, as well as natural proguanylin, revealing both proteins to be monomeric at the applied solution conditions (Lauber *et al.*, 2002), thus confuting former suggestions of proguanylin being a dimer in solution. Based on the NMR spectra of the homogeneously ^{15}N and $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ labeled recombinant protein, as well as the natural protein, a total of 700 experimental restraints could be derived that were used for structure calculation. The solution structure of proguanylin adopts a new protein fold and consists of a three helix bundle, a small three stranded β -sheet of two NH_2 -terminal strands and one COOH -terminal strand, and an unstructured linker region of 23 amino acid residues. In the proguanylin structure the sequence corresponding to guanylin is fixed in its bioactive topology and is stabilized by interactions with the NH_2 -terminal β -hairpin: the hormone region (residues 80-94) partly wraps around the first four NH_2 -terminal residues that thereby shield parts of the hormone surface. In addition to observed contacts between the side chain of Arg72 and that of Tyr88, which is essential for receptor activation, the interactions connecting

the termini provide an explanation for the negligible bioactivity of the prohormone. The latter interactions also explain the important role of the NH₂-terminal residues in the disulfide-coupled folding of proguanylin (Lauber *et al.*, 2003). Analysis of the mutant proteins proguanylin-C48S/C61S and proguanylin-C86S/C94S supports these findings and suggests an essential stabilizing function of the disulfide bond between Cys48 and Cys61 on the overall threedimensional structure, as well as a direct influence of the prosequence on the structure of the hormone region. Additionally, using the data derived from a proguanylin deletion mutant a structural model of the homologous uroguanylin precursor protein was generated.

Based on the crystal structure of the extracellular domain of the homologous ANP-receptor a model structure of the GC-C_{ECD} was generated. Mapping of the known biochemical data on this structural model restricts the ligand binding region to a sequence around an exposed and accessible β -strand located in the membrane proximal subdomain, thus implying a guanylin/receptor interaction comparable to the intramolecular interactions observed between guanylin and its prosequence. Due to its size and oligomerization state, the complete extracellular domain of GC-C is not accessible for structural studies of the interaction with its ligands guanylin, uroguanylin, and STa using NMR spectroscopy. Therefore, a smaller soluble and properly folded receptor fragment with the ability to bind these ligands was required. For this purpose, miniGC-C, a fragment corresponding to the membrane proximal subdomain was designed, featuring the mentioned properties with a binding affinity to STp-(5-17) in the nanomolar range ($K_D = 13 \pm 7$ nM; Tidten, 2003). Finally, the established system for the recombinant expression and purification of proguanylin is a prerequisite for the production of ¹⁵N and ¹³C/¹⁵N labeled guanylin and thus for further NMR studies of the hormone/GC-C interaction.

9. Abkürzungsverzeichnis

$[\Theta]_{\text{MRW}}$	mittlere residuale Elliptizität
1D	eindimensional
2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
Abb.	Abbildung
ANP	<i>atrial natriuretic peptide</i>
Ap ^R	Ampicillinresistenz
APS	Ammoniumperoxodisulfat
β-ME	β-Mercaptoethanol
BCA	Bichinchoninsäure
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CD	Circulardichroismus
cDNA	<i>copy-Desoxyribonukleinsäure</i>
CFTR	<i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
COSY	<i>correlated spectroscopy</i>
CSI	Chemischer Verschiebungsindex (<i>chemical shift index</i>)
CZE	Kapillarzonenoelektrophorese
Da	Dalton
DEAE	Diethylaminoethyl
deg	Grad
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EK	Enterokinase
ESI	<i>elektrospray-ionization</i>
FID	<i>free induction decay</i>
GC-A	Guanylatzyklase-A, auch als ANP-Rezeptor bezeichnet
GC-C	Guanylatzyklase-C; <i>guanylyl cyclase C</i>
GC-C _{ECD}	extrazelluläre Domäne der Guanylatzyklase-C; GC-C <i>extracellular ligand binding domain</i>
GSH	Glutathion
HMQC	<i>heteronuclear multiple quantum correlated spectroscopy</i>
HSQC	<i>heteronuclear single quantum correlated spectroscopy</i>

IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
kan	Kanamycinresistenz
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani (Medium)
M	mol/l
MALDI-TOF	<i>matrix assisted laser desorption ionization - time of flight</i>
M9	M9-Minimalmedium
MCS	<i>multiple cloning site</i>
NHE-3	Na ⁺ /H ⁺ -Austauscher 3
NMR	kernmagnetische Resonanz
NOE	<i>nuclear Overhauser enhancement</i> ; wird auch als Bezeichnung einer Kreuzresonanz im NOESY Spektrum verwendet
NOESY	<i>nuclear Overhauser enhancement spectroscopy</i>
NPR-C	<i>natriuretic peptide clearance receptor</i>
M	Molekulargewicht
MW	Molekulargewicht
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
PCR	Polymerasekettenreaktion
PKA-II	cAMP-abhängige Proteinkinase A-II
PKG-II	cGMP-abhängige Proteinkinase II
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RMSD	<i>root mean square deviation</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RP-HPLC	<i>reversed phase high-performance liquid chromatography</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
<i>s</i>	Sedimentationskoeffizient
SAP	<i>shrimp alkaline phosphatase</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
s.o.	siehe oben
STa	hitze stabile Enterotoxine aus <i>E. coli</i>
STh	von <i>E. coli</i> in Menschen gebildetes ST (humanes ST)
STp	von <i>E. coli</i> in Schweinen gebildetes ST (porcines ST)
SW	spektrale Weite
<i>tag</i>	Anhang
Tc ^R	Tetracyclinresistenz

TD	Zahl der komplexen Datenpunkte
TEMED	N-,N-,N',N'-Tetramethylenethyldiamin
TFA	Trifloressigsäure
TOCSY	<i>total correlated spectroscopy</i>
TPPI	<i>time proportional phase incrementation</i>
Trx	Thioredoxin
ÜNK	Übernachtskultur
UV	ultraviolett
v/v	Volumen je Volumen
Vol.	Bettvolumen
ω	Frequenz
w/v	Gewicht je Volumen

10. Literaturverzeichnis

10.1 Allgemeines Literaturverzeichnis

- Agashe, V. R. und Udgaonkar, J. B. (1995): Thermodynamics of denaturation of barstar: evidence for cold denaturation and evaluation of the interaction with guanidine hydrochloride. *Biochemistry*, **34**, 3286-3299.
- Armstrong, N., Sun, Y., Chen, G. Q. und Gouaux, E. (1998): Structure of a glutamate-receptor ligand-binding core in complex with kainate. *Nature*, **395**, 913-917.
- Barkhuijsen, H., de Beer, R., Bovee, W. M. M. J. und van Ormondt, D. (1985): Retrieval of frequencies, amplitudes, damping factors, and phases from time-domain signals using a linear least-squares procedure. *J.Magn.Reson.*, **61**, 465-481.
- Bhandari, R., Srinivasan, N., Mahaboobi, M., Ghanekar, Y., Suguna, K. und Visweswariah, S. S. (2001): Functional inactivation of the human guanylyl cyclase C receptor: modeling and mutation of the protein kinase-like domain. *Biochemistry*, **40**, 9196-9206.
- Bhandari, R., Suguna, K. und Visweswariah, S. S. (1999): Guanylyl cyclase C receptor: regulation of catalytic activity by ATP. *Biosci.Rep.*, **19**, 179-188.
- Brünger A.T. (1993): X-PLOR Version 3.1: A system for X-ray crystallography and NMR. Yale University Press, New Haven, CT.
- Carpick, B. W. und Gariepy, J. (1991): Structural characterization of functionally important regions of the Escherichia coli heat-stable enterotoxin STIb. *Biochemistry*, **30**, 4803-4809.
- Carrithers, S. L., Hill, M. J., Johnson, B. R., O'Hara, S. M., Jackson, B. A., Ott, C. E., Lorenz, J., Mann, E. A., Giannella, R. A., Forte, L. R. und Greenberg, R. N. (1999): Renal effects of uroguanylin and guanylin in vivo. *Braz.J.Med.Biol.Res.*, **32**, 1337-1344.
- Chakrabartty, A., Kortemme, T., Padmanabhan, S. und Baldwin, R. L. (1993): Aromatic side-chain contribution to far-ultraviolet circular dichroism of helical peptides and its effect on measurement of helix propensities. *Biochemistry*, **32**, 5560-5565.
- Chao, A. C., de Sauvage, F. J., Dong, Y. J., Wagner, J. A., Goeddel, D. V. und Gardner, P. (1994): Activation of intestinal CFTR Cl⁻ channel by heat-stable enterotoxin and guanylin via cAMP-dependent protein kinase. *EMBO J.*, **13**, 1065-1072.
- Chinkers, M. und Wilson, E. M. (1992): Ligand-independent oligomerization of natriuretic peptide receptors. Identification of heteromeric receptors and a dominant negative mutant. *J.Biol.Chem.*, **267**, 18589-18597.

- Chu, S. H. W. und Walker, A. (1993): Bacterial toxin interaction with the developing intestine. *Gastroenterology*, **104**, 916-925.
- Claverie, J. M. (1976): Sedimentation of generalized systems of interacting particles. III. Concentration-dependent sedimentation and extension to other transport methods. *Biopolymers*, **15**, 843-857.
- Clore, G. M., Gronenborn, A. M. und Tjandra, N. (1998): Direct Structure Refinement against Residual Dipolar Couplings in the Presence of Rhombicity of Unknown Magnitude. *Journal of Magnetic Resonance*, **131**, 159-162.
- Cohen, S. N., Chang, A. C. und Hsu, L. (1972): Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **69**, 2110-2114.
- Crasto, C. J. und Feng, J. (2001): Sequence codes for extended conformation: a neighbor-dependent sequence analysis of loops in proteins. *Proteins*, **42**, 399-413.
- Currie, M. G., Fok, K. F., Kato, J., Moore, R. J., Hamra, F. K., Duffin, K. L. und Smith, C. E. (1992): Guanylin: an endogenous activator of intestinal guanylate cyclase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **89**, 947-951.
- Dayie, K. T. und Wagner, G. (1994): Relaxation-Rate Measurements for ^{15}N - ^1H Groups with Pulsed-Field Gradients and Preservation of Coherence Pathways. *J.Magn.Reson., Series A*, **111**, 121-126.
- de Sauvage, F. J., Keshav, S., Kuang, W. J., Gillett, N., Henzel, W. und Goeddel, D. V. (1992): Precursor structure, expression, and tissue distribution of human guanylin. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **89**, 9089-9093.
- Derman, A. I., Prinz, W. A., Belin, D. und Beckwith, J. (1993): Mutations that allow disulfide bond formation in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Science*, **262**, 1744-1747.
- Dizhoor, A. M. und Hurley, J. B. (1999): Regulation of photoreceptor membrane guanylyl cyclases by guanylyl cyclase activator proteins. *Methods*, **19**, 521-531.
- Dower, W. J., Miller, J. F. und Ragsdale, C. W. (1988): High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res*, **16**, 6127-6145.
- Düx, P., Whitehead, B., Boelens, R., Kaptein, R. und Vuister, G. W. (1997): Measurements of ^{15}N - ^1H couplings constants in uniformly ^{15}N -labeled proteins: Application to the photoactive yellow protein. *J.Biomol.NMR*, **10**, 301-306.

- Eggenberger, U., Schmidt, P., Sattler, M., Glaser, S. J. und Griesinger, C. (1992): Frequency-Selective Decoupling with Recursively Expanded Soft Pulses in Multinuclear NMR. *J.Magn.Reson.*, **100**, 604-610.
- Emsley, L. und Bodenhausen, G. (1990): Gaussian pulse cascades: New analytical functions for rectangular selective inversion and in-phase excitation in NMR. *Chem.Phys.Lett.*, **165**, 469-476.
- Fan, X., Wang, Y., London, R. M., Eber, S. L., Krause, W. J., Freeman, R. H. und Forte, L. R. (1997): Signaling pathways for guanylin and uroguanylin in the digestive, renal, central nervous, reproductive, and lymphoid systems. *Endocrinology*, **138**, 4636-4648.
- Fawcus, K., Gorton, V. J., Lucas, M. L. und McEwan, G. T. (1997): Stimulation of three distinct guanylate cyclases induces mucosal surface alkalinisation in rat small intestine in vitro. *Comp.Biochem.Physiol.A.Physiol.*, **118**, 291-295.
- Field, M. und Semrad, C. E. (1993): Toxigenic diarrheas, congenital diarrheas, and cystic fibrosis: disorders of intestinal ion transport. *Annu.Rev.Physiol*, **55**, 631-655.
- Folmer, R. H., Hilbers, C. W., Konings, R. N. und Nilges, M. (1997): Floating stereospecific assignment revisited: application to an 18 kDa protein and comparison with J-coupling data. *J.Biomol.NMR*, **9**, 245-258.
- Fonteles, M. C., Greenberg, R. N., Monteiro, H. S., Currie, M. G. und Forte, L. R. (1998): Natriuretic and kaliuretic activities of guanylin and uroguanylin in the isolated perfused rat kidney. *Am.J.Physiol.*, **275**, F191-F197.
- Forte, L. R. (1999): Guanylin regulatory peptides: structures, biological activities mediated by cyclic GMP and pathobiology. *Regul.Pept.*, **81**, 25-39.
- Forte, L. R., Freeman, R. H., Krause, W. J. und London, R. M. (1999): Guanylin peptides: cyclic GMP signaling mechanisms. *Braz.J.Med.Biol.Res*, **32**, 1329-1336.
- Forte, L. R., London, R. M., Freeman, R. H. und Krause, W. J. (2000): Guanylin peptides: renal actions mediated by cyclic GMP. *Am.J.Physiol Renal Physiol.*, **278**, F180-F191.
- French, P. J., Bijman, J., Edixhoven, M., Vaandrager, A. B., Scholte, B. J., Lohmann, S. M., Nairn, A. C. und de Jonge, H. R. (1995): Isotype-specific activation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-chloride channels by cGMP-dependent protein kinase II. *J.Biol.Chem.*, **270**, 26626-26631.
- Frenkiel, T., Bauer, C., Carr, M. D., Birdsall, B. und Feeney, J. (1990): HMQC-NOESY-

- HMQC, a Three-Dimensional NMR Experiment Which Allows Detection of Nuclear Overhauser Effects between Protons with Overlapping Signals. *J.Magn.Reson.*, **90**, 420-425.
- Friedrich, M. S. (1995): A Model-free algorithm for the removal of baseline artifacts. *J.Biomol.NMR*, **5**, 147-153.
- Fulle, H. J., Vassar, R., Foster, D. C., Yang, R. B., Axel, R. und Garbers, D. L. (1995): A receptor guanylyl cyclase expressed specifically in olfactory sensory neurons. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **92**, 3571-3575.
- Garbers, D. L. (1999): The guanylyl cyclase receptors. *Methods*, **19**, 477-484.
- Garcia, K. C., de Sauvage, F. J., Struble, M., Henzel, W., Reilly, D. und Goeddel, D. V. (1993): Processing and characterization of human proguanylin expressed in *Escherichia coli*. *J.Biol.Chem.*, **268**, 22397-22401.
- Garipey, J., Judd, A. K. und Schoolnik, G. K. (1987): Importance of disulfide bridges in the structure and activity of *Escherichia coli* enterotoxin ST1b. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **84**, 8907-8911.
- Geen, H. und Freeman, R. (1991): Band-Selective Radiofrequency Pulses. *J.Magn.Reson.*, **93**, 93-141.
- Giannella, R. A. (1981): Pathogenesis of acute bacterial diarrheal disorders. *Annu.Rev.Med.*, **32**, 341-357.
- Grant SG, Jesse J, Bloom FR, Hanahan D. (1990): Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **87**, 4645-4649.
- Greenfield, N. und Fasman, G. D. (1969): Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. *Biochemistry*, **8**, 4108-4116.
- Grzesiek, S. und Bax, A. (1992a): Improved 3D Triple-Resonance NMR Techniques Applied to a 31-kDa Protein. *J.Magn.Reson.*, **96**, 432-440.
- Grzesiek, S. und Bax, A. (1992b): Correlating Backbone Amide and Side-Chain Resonances in Larger Proteins By Multiple Relayed Triple Resonance NMR. *J.Am.Chem.Soc.*, **114**, 6291-6293.

- Grzesiek, S., Anglister, J. und Bax, A. (1993): Correlation of Backbone Amide and Aliphatic Side-Chain Resonances in $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -Enriched Proteins by Isotropic Mixing of ^{13}C Magnetization. *J.Magn.Reson., Series B*, **101**, 114-119.
- Grzesiek, S. und Bax, A. (1993a): The Importance of Not Saturating H_2O in Protein NMR. Application to Sensitivity Enhancement and NOE Measurements. *J.Am.Chem.Soc.*, **115**, 12593-12594.
- Grzesiek, S. und Bax, A. (1993b): Amino acid type determination in the sequential assignment procedure of uniformly $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -enriched proteins. *J.Biomol.NMR*, **3**, 185-204.
- Guex, N. und Peitsch, M. C. (1997): SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*, **18**, 2714-2723.
- Hamra, F. K., Forte, L. R., Eber, S. L., Pidhorodeckyj, N. V., Krause, W. J., Freeman, R. H., Chin, D. T., Tompkins, J. A., Fok, K. F., Smith, C. E., Duffin, K. L., Siegel, N. R. und Currie, M. G. (1993): Uroguanylin: structure and activity of a second endogenous peptide that stimulates intestinal guanylate cyclase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **90**, 10464-10468.
- Hamra, F. K., Fan, X., Krause, W. J., Freeman, R. H., Chin, D. T., Smith, C. E., Currie, M. G. und Forte, L. R. (1996): Prouroguanylin and proguanylin: purification from colon, structure, and modulation of bioactivity by proteases. *Endocrinology*, **137**, 257-265.
- Hamra, F. K., Eber, S. L., Chin, D. T., Currie, M. G. und Forte, L. R. (1997): Regulation of intestinal uroguanylin/guanylin receptor-mediated responses by mucosal acidity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **94**, 2705-2710.
- Hanahan, D. (1983): Kapitel: Techniques for Transformation of *E. coli*. IRL Press, Oxford, 109-135.
- Hansen, M. R., Mueller, L. und Pardi, A. (1998): Tunable alignment of macromolecules by filamentous phage yields dipolar coupling interactions. *Nat.Struct.Biol.*, **5**, 1065-1074.
- Hasegawa, M., Kawano, Y., Matsumoto, Y., Hidaka, Y., Fujii, J., Taniguchi, N., Wada, A., Hirayama, T. und Shimonishi, Y. (1999a): Expression and characterization of the extracellular domain of guanylyl cyclase C from a baculovirus and Sf21 insect cells. *Protein Expr.Purif.*, **15**, 271-281.
- Hasegawa, M., Hidaka, Y., Matsumoto, Y., Sanni, T. und Shimonishi, Y. (1999b): Determination of the binding site on the extracellular domain of guanylyl cyclase C to heat-stable enterotoxin. *J.Biol.Chem.*, **274**, 31713-31718.

- Hasegawa, M., Hidaka, Y., Wada, A., Hirayama, T. und Shimonishi, Y. (1999c): The relevance of N-linked glycosylation to the binding of a ligand to guanylate cyclase C. *Eur.J.Biochem.*, **263**, 338-346.
- He, X., Chow, D., Martick, M. M. und Garcia, K. C. (2001): Allosteric activation of a spring-loaded natriuretic peptide receptor dimer by hormone. *Science*, **293**, 1657-1662.
- Heim, J. M., Singh, S. und Gerzer, R. (1996): Effect of glycosylation on cloned ANF-sensitive guanylyl cyclase. *Life Sci.*, **59**, L61-L68.
- Hess, R., Kuhn, M., Schulz-Knappe, P., Raida, M., Fuchs, M., Klodt, J., Adermann, K., Kaefer, V., Cetin, Y. und Forssmann, W. G. (1995): GCAP-II: isolation and characterization of the circulating form of human uroguanylin. *FEBS Lett.*, **374**, 34-38.
- Hidaka, Y., Ohno, M., Hemmasi, B., Hill, O., Forssmann, W. G. und Shimonishi, Y. (1998): In vitro disulfide-coupled folding of guanylyl cyclase-activating peptide and its precursor protein. *Biochemistry*, **37**, 8498-8507.
- Hidaka, Y., Shimono, C., Ohno, M., Okumura, N., Adermann, K., Forssmann, W. G. und Shimonishi, Y. (2000): Dual function of the propeptide of prouroguanylin in the folding of the mature peptide: disulfide-coupled folding and dimerization. *J.Biol.Chem.*, **275**, 25155-25162.
- Hidaka, Y., Matsumoto, Y. und Shimonishi, Y. (2002): The micro domain responsible for ligand-binding of guanylyl cyclase C. *FEBS Lett.*, **526**, 58-62.
- Hill, J. M., Alewood, P. F. und Craik, D. J. (1996): Three-dimensional solution structure of mu-conotoxin GIIIB, a specific blocker of skeletal muscle sodium channels. *Biochemistry*, **35**, 8824-8835.
- Hill, O., Cetin, Y., Cieslak, A., Mägert, H. J. und Forssmann, W. G. (1995a): A new human guanylate cyclase-activating peptide (GCAP-II, uroguanylin): precursor cDNA and colonic expression. *Biochim.Biophys.Acta*, **1253**, 146-149.
- Hill, O., Kuhn, M., Zucht, H. D., Cetin, Y., Kulaksiz, H., Adermann, K., Klock, G., Rechkemmer, G., Forssmann, W. G. und Mägert, H. J. (1995b): Analysis of the human guanylin gene and the processing and cellular localization of the peptide. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **92**, 2046-2050.
- Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K. und Pease, L. R. (1989): Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene*, **77**, 51-59.

- Holm, L. und Sander, C. (1993): Protein structure comparison by alignment of distance matrices. *J.Mol.Biol.*, **233**, 123-138.
- Hurley, J. H. (1998): The adenylyl and guanylyl cyclase superfamily. *Curr.Opin.Struct.Biol.*, **8**, 770-777.
- Ikura, M., Bax, A., Clore, G. M. und Gronenborn, A. M. (1990a): Detection of Nuclear Overhauser Effects between Degenerate Amide Proton Resonances by Heteronuclear Three-Dimensional Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *J.Am.Chem.Soc.*, **112**, 9020-9022.
- Ikura, M., Kay, L. E. und Bax, A. (1990b): A novel approach for sequential assignment of ^1H , ^{13}C , and ^{15}N spectra of proteins: heteronuclear triple-resonance three-dimensional NMR spectroscopy. Application to calmodulin. *Biochemistry*, **29**, 4659-4667.
- Ikura, M., Kay, L. E., Tschudin, R. und Bax, A. (1990c): Three-Dimensional NOESY-HMQC Spectroscopy of a ^{13}C -Labeled Protein. *J.Magn.Reson.*, **86**, 204-209.
- Jones, D. T. (1999): Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *J.Mol.Biol.*, **292**, 195-202.
- Joo, N. S., London, R. M., Kim, H. D., Forte, L. R. und Clarke, L. L. (1998): Regulation of intestinal Cl^- and HCO_3^- -secretion by uroguanylin. *Am.J.Physiol*, **274**, G633-G644.
- Kaefer, V. und Resch, K. (1985): Are cyclic nucleotides involved in the initiation of mitogenic activation of human lymphocytes? *Biochim.Biophys.Acta*, **846**, 216-225.
- Karplus, M. (1959): Contact electron-spin coupling of nuclear magnetic moments. *J.Chem.Phys.*, **30**, 11-15.
- Kay, L. E., Torchia, D. A. und Bax, A. (1989): Backbone dynamics of proteins as studied by ^{15}N inverse detected heteronuclear NMR spectroscopy: application to staphylococcal nuclease. *Biochemistry*, **28**, 8972-8979.
- Kay, L. E., Keifer, P. und Saarinen, T. (1992): Pure absorption gradient enhanced heteronuclear single quantum correlation spectroscopy with improved sensitivity. *J.Am.Chem.Soc.*, **114**, 10663-10665.
- Kämpf, U., Kruhøffer, M., Bargsten, G., Grube, D., Forssmann, W. G. und Cetin, Y. (1996): Guanylin and its receptor (guanylyl cyclase C): expression and cell specific localization in the gastrointestinal tract. *Regulatory Peptides*, **64**, 85-85.

- Kelley, L. A., MacCallum, R. M. und Sternberg, M. J. (2000): Enhanced genome annotation using structural profiles in the program 3D- PSSM. *J.Mol.Biol.*, **299**, 501-522.
- Kita, T., Smith, C. E., Fok, K. F., Duffin, K. L., Moore, W. M., Karabatsos, P. J., Kachur, J. F., Hamra, F. K., Pidhorodeckyj, N. V., Forte, L. R. und Currie, M. G. (1994): Characterization of human uroguanylin: a member of the guanylin peptide family. *Am.J.Physiol*, **266**, F342-F348.
- Klodt, J., Kuhn, M., Marx, U. C., Martin, S., Rösch, P., Forssmann, W. G. und Adermann, K. (1997): Synthesis, biological activity and isomerism of guanylate cyclase C- activating peptides guanylin and uroguanylin. *J.Pept.Res*, **50**, 222-230.
- Koradi, R., Billeter, M. und Wüthrich, K. (1996): MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures. *J.Mol.Graph.*, **14**, 51-55.
- Kowit, J. D. und Maloney, J. (1982): Protein cleavage by boiling in sodium dodecyl sulfate prior to electrophoresis. *Anal.Biochem.*, **123**, 86-93.
- Kraulis, J., Clore, G. M., Nilges, M., Jones, T. A., Pettersson, G., Knowles, J. und Gronenborn, A. M. (1989): Determination of the three-dimensional solution structure of the C- terminal domain of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. A study using nuclear magnetic resonance and hybrid distance geometry-dynamical simulated annealing. *Biochemistry*, **28**, 7241-7257.
- Kraulis, P. (1991): MOLSCRIPT: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *J.Appl.Crystallogr.*, **24**, 946-950.
- Kuboniwa, H., Grzesiek, S., Delaglio, F. und Bax, A. (1994): Measurement of HN-H alpha J couplings in calcium-free calmodulin using new 2D and 3D water-flip-back methods. *J.Biomol.NMR*, **4**, 871-878.
- Kuhn, M., Raida, M., Adermann, K., Schulz-Knappe, P., Gerzer, R., Heim, J. M. und Forssmann, W. G. (1993): The circulating bioactive form of human guanylin is a high molecular weight peptide (10.3 kDa). *FEBS Lett.*, **318**, 205-209.
- Kunishima, N., Shimada, Y., Tsuji, Y., Sato, T., Yamamoto, M., Kumasaka, T., Nakanishi, S., Jingami, H. und Morikawa, K. (2000): Structural basis of glutamate recognition by a dimeric metabotropic glutamate receptor. *Nature*, **407**, 971-977.
- Kuszewski, J., Gronenborn, A. M. und Clore, G. M. (1996): Improving the quality of NMR and crystallographic protein structures by means of a conformational database potential derived from structure databases. *Protein Sci.*, **5**, 1067-1080.

- Kuszewski, J. und Clore, G. M. (2000): Sources of and Solutions to Problems in the Refinement of Protein NMR Structures against Torsion Angle Potentials of Mean Force. *J.Magn.Reson.*, **146**, 249-254.
- La Rosa, Stern und Hoch (1996): Rowland NMR Toolkit. Rowland Institute for Science.
- Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lamm, O. (1929): Die Differentialgleichung der Ultrazentrifugierung. *Ark.Mat.Astr.Fys.*, **21**, 1-4.
- Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S. und Thornton, J. M. (1993): PROCHECK: A program to check the stereochemical quality of protein structures. *J.Appl.Cryst*, **26**, 283-291.
- Lauber, T., Marx, U. C., Schulz, A., Kreutzmann, P., Rösch, P. und Hoffmann, S. (2001): Accurate disulfide formation in *Escherichia coli*: overexpression and characterization of the first domain (HF6478) of the multiple Kazal-type inhibitor LEKTI. *Protein Expr.Purif.*, **22**, 108-112.
- Lauber, T., Nourse, A., Schulz, A. und Marx, U. C. (2002): Native and Recombinant Proguanylin Feature Identical Biophysical Properties and Are Monomeric in Solution. *Biochemistry*, **41**, 14602-14612.
- Lauber, T., Neudecker, P., Rösch, P. und Marx, U. C. (2003): Solution structure of human proguanylin: The role of a hormone prosequence. *J.Biol.Chem.*, **278**, 24118-24124.
- Laue, T. M., Shah, B. D., Ridgeway, T. M. und Pelletier, S. L. (1992): Analytical Ultracentrifugation in Biochemistry and Polymer Science. *The Royal Society of Chemistry, Cambridge, United Kingdom*, 90-125.
- LaVallie, E. R., DiBlasio, E. A., Kovacic, S., Grant, K. L., Schendel, P. F. und McCoy, J. M. (1993): A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm. *Biotechnology (N.Y.)*, **11**, 187-193.
- Liu, Y., Ruoho, A. E., Rao, V. D. und Hurley, J. H. (1997): Catalytic mechanism of the adenylyl and guanylyl cyclases: modeling and mutational analysis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **94**, 13414-13419.
- Lucas, K. A., Pitari, G. M., Kazerounian, S., Ruiz-Stewart, I., Park, J., Schulz, S., Chepenik, K. P. und Waldman, S. A. (2000): Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP.

- Pharmacol.Rev.*, **52**, 375-414.
- Mann, E. A., Jump, M. L., Wu, J., Yee, E. und Giannella, R. A. (1997): Mice lacking the guanylyl cyclase C receptor are resistant to STA- induced intestinal secretion. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, **239**, 463-466.
- Marion, D., Ikura, M., Tschudin, R. und Bax, A. (1989): Rapid recording of 2D NMR spectra without phase cycling. Applications to the study of hydrogen exchange in proteins. *J.Magn.Reson.*, **85**, 393-399.
- Markley, J. L., Bax, A., Arata, Y., Hilbers, C. W., Kaptein, R., Sykes, B. D., Wright, P. E. und Wüthrich, K. (1998): Recommendations for the Presentation of NMR Structures of Proteins and Nucleic Acids. *Pure Appl.Chem.*, **70**, 117-142.
- Marx, U. C., Klodt, J., Meyer, M., Gerlach, H., Rösch, P., Forssmann, W. G. und Adermann, K. (1998): One peptide, two topologies: structure and interconversion dynamics of human uroguanylin isomers. *J.Pept.Res*, **52**, 229-240.
- Marx, U. C., Adermann, K., Schulz, A., Meyer, M., Forssmann, W.-G. und Rösch, P. (2001): Structures of Human Peptide Hormones in Solution. in: Nato ASI Series (O. Jardetzky, ed.), Life Sciences, **315**, pp. 145 - 161.
- Merritt, E. A. und Murphy, M. E. P. (1994): Raster3D Version 2.0, a program for photorealistic molecular graphics. *Acta Cryst*, **D50**, 869-873.
- Minor, D.L. Jr. und Kim, P.S. (1994): Measurement of the beta-sheet-forming propensities of amino acids. *Nature*, **367**, 660-663.
- Miyazato, M., Nakazato, M., Yamaguchi, H., Date, Y., Kojima, M., Kangawa, K., Matsuo, H. und Matsukura, S. (1996a): Cloning and characterization of a cDNA encoding a precursor for human uroguanylin. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, **219**, 644-648.
- Miyazato, M., Nakazato, M., Matsukura, S., Kangawa, K. und Matsuo, H. (1996b): Uroguanylin gene expression in the alimentary tract and extra- gastrointestinal tissues. *FEBS Lett.*, **398**, 170-174.
- Mori, S., Abeygunawardana, C., Johnson, M. O. und Vanzijl, P. C. M. (1995): Improved Sensitivity of HSQC Spectra of Exchanging Protons at Short Interscan Delays Using a New Fast HSQC (FHSQC) Detection Scheme That Avoids Water Saturation. *J.Magn.Reson., Series B*, **108**, 94-98.

- Nakazato, M., Yamaguchi, H., Shiomi, K., Date, Y., Fujimoto, S., Kangawa, K., Matsuo, H. und Matsukura, S. (1994): Identification of 10-kDa proguanylin as a major guanylin molecule in human intestine and plasma and its increase in renal insufficiency. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, **205**, 1966-1975.
- Neudecker, P., Sticht, H. und Rösch, P. (2001): Improving the efficiency of the Gaussian conformational database potential for the refinement of protein and nucleic acid structures. *J.Biomol.NMR*, **21**, 373-375.
- Nilges, M. (1993): A calculation strategy for the structure determination of symmetric dimers by ^1H NMR. *Proteins*, **17**, 297-309.
- Novy, R., Berg, J., Yaeger, K. und Mierendorf, R. (1995): pET TRX Fusion System for Increased Solubility of Proteins Expressed in *E. coli*. *in* *Novations*, **3**, 7-9.
- Ozaki, H., Sato, T., Kubota, H., Hata, Y., Katsube, Y. und Shimonishi, Y. (1991): Molecular structure of the toxin domain of heat-stable enterotoxin produced by a pathogenic strain of *Escherichia coli*. A putative binding site for a binding protein on rat intestinal epithelial cell membranes. *J.Biol.Chem.*, **266**, 5934-5941.
- Porath, J. (1992): Immobilized metal ion affinity chromatography. *Protein Expr.Purif.*, **3**, 263-281.
- Potter, L. R. und Hunter, T. (2001): Guanylyl cyclase-linked natriuretic peptide receptors: structure and regulation. *J.Biol.Chem.*, **276**, 6057-6060.
- Powell, M. J. D. (1977): Restart procedures for the conjugate gradient method. *Mathemat.Progr.*, **12**, 241-254.
- Prinz, W. A., Aslund, F., Holmgren, A. und Beckwith, J. (1997): The role of the thioredoxin and glutaredoxin pathways in reducing protein disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm. *J.Biol.Chem.*, **272**, 15661-15667.
- Ralston, G. (1993): Introduction to Analytical Ultracentrifugation. Beckman Instruments, Inc., Fullerton, CA.
- Richardson, J. S. und Richardson, D. C. (1988): Amino acid preferences for specific locations at the ends of alpha helices. *Science*, **240**, 1648-1652.
- Rittenhouse, J. und Marcus, F. (1984): Peptide mapping by polyacrylamide gel electrophoresis after cleavage at aspartyl-prolyl peptide bonds in sodium dodecyl sulfate-containing buffers. *Anal.Biochem.*, **138**, 442-448.

- Rudner, X. L., Mandal, K. K., de Sauvage, F. J., Kindman, L. A. und Almenoff, J. S. (1995): Regulation of cell signaling by the cytoplasmic domains of the heat- stable enterotoxin receptor: identification of autoinhibitory and activating motifs. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **92**, 5169-5173.
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. und Arnheim, N. (1985): Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, **230**, 1350-1354.
- Sattler, M., Schwendinger, M. G., Schleucher, J. und Griesinger, C. (1995): Novel strategies for the sensitivity enhancement in heteronuclear multidimensional NMR experiments employing pulsed field gradients. *J.Biomol.NMR*, **5**, 11-22.
- Sattler, M., Schleucher, J. und Griesinger, C. (1999): Heteronuclear multidimensional NMR experiments for the structure determination of proteins in solution employing pulsed field gradients. *Prog.NMR Spectrosc.*, **34**, 93-158.
- Sayle, R. (1995): RasMol V2.6 molecular visualisation programme. Glaxo Wellcome Research and Development, Stevenage, Hertfordshire, UK.
- Schleucher, J., Schwendinger, M. G., Sattler, M., Schmidt, P., Schedletzky, O., Glaser, S. J., Sørensen, O. W. und Griesinger, C. (1994): A general enhancement scheme in heteronuclear multidimensional NMR employing pulsed field gradients. *J.Biomol.NMR*, **4**, 301-306.
- Schmid, F. X. (1989): Protein Structure: A Practical Approach. JRL Press, Oxford.
- Schrader, M., Jürgens, M., Hess, R., Schulz-Knappe, P., Raida, M. und Forssmann, W. G. (1997): Matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry guided purification of human guanylin from blood ultrafiltrate. *J.Chromatogr.A*, **776**, 139-145.
- Schuck, P. (1998): Sedimentation analysis of noninteracting and self-associating solutes using numerical solutions to the Lamm equation. *Biophys.J.*, **75**, 1503-1512.
- Schuck, P. (2000): Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and lamm equation modeling. *Biophys.J.*, **78**, 1606-1619.
- Schuck, P., Perugini, M. A., Gonzales, N. R., Howlett, G. J. und Schubert, D. (2002): Size-distribution analysis of proteins by analytical ultracentrifugation: strategies and application to model systems. *Biophys.J.*, **82**, 1096-1111.

- Schulz, A., Escher, S., Marx, U. C., Meyer, M., Rösch, P., Forssmann, W. G. und Adermann, K. (1998): Carboxy-terminal extension stabilizes the topological stereoisomers of guanylin. *J.Pept.Res*, **52**, 518-525.
- Schulz, A., Marx, U. C., Hidaka, Y., Shimonishi, Y., Rösch, P., Forssmann, W. G. und Adermann, K. (1999): Role of the prosequence of guanylin. *Protein Sci.*, **8**, 1850-1859.
- Schulz, A. (2000): Differentielle Struktur-Aktivitätsrelation der Guanylatzyklase-C aktivierenden Peptidhormone Guanylin und Uroguanylin. Dissertation, Universität Hannover.
- Schulz, S., Green, C. K., Yuen, P. S. und Garbers, D. L. (1990): Guanylyl cyclase is a heat-stable enterotoxin receptor. *Cell*, **63**, 941-948.
- Schulz, S., Chrisman, T. D. und Garbers, D. L. (1992): Cloning and expression of guanylin. Its existence in various mammalian tissues. *J.Biol.Chem.*, **267**, 16019-16021.
- Schulz, S., Lopez, M. J., Kuhn, M. und Garbers, D. L. (1997): Disruption of the guanylyl cyclase-C gene leads to a paradoxical phenotype of viable but heat-stable enterotoxin-resistant mice. *J.Clin.Invest*, **100**, 1590-1595.
- Schweimer, K. (2000): Mehrdimensionale heteronukleare NMR Spektroskopie zur Bestimmung der Strukturen des Birkenpollenallergens Bet v 1, des *Guillardia theta* Rubredoxins und des [2Fe-2S] Ferredoxins aus *Haliobacterium salinarum*.. Dissertation, Universität Bayreuth.
- Schweimer, K., Hoffmann, S., Bauer, F., Friedrich, U., Kardinal, C., Feller, S. M., Biesinger, B. und Sticht, H. (2002): Structural investigation of the binding of a herpesviral protein to the SH3 domain of tyrosine kinase Lck. *Biochemistry*, **41**, 5120-5130.
- Shaka, A., Barker, P. B. und Freeman, R. (1985): Computer-optimized decoupling scheme for wideband applications and low-level operation. *J.Magn.Reson.*, **64**, 547-552.
- Shaka, A. J., Keeler, J., Frenkiel, T. und Freeman, R. (1983): An Improved Sequence for Broadband Decoupling: WALTZ-16. *J.Magn.Reson.*, **52**, 335-338.
- Shimonishi, Y., Hidaka, Y., Koizumi, M., Hane, M., Aimoto, S., Takeda, T., Miwatani, T. und Takeda, Y. (1987): Mode of disulfide bond formation of a heat-stable enterotoxin (STh) produced by a human strain of enterotoxigenic Escherichia coli. *FEBS Lett.*, **215**, 165-170.
- Shoemaker, K. R., Kim, P. S., York, E. J., Stewart, J. M. und Baldwin, R. L. (1987): Tests of

- the helix dipole model for stabilization of alpha-helices. *Nature*, **326**, 563-567.
- Singh, S., Singh, G., Heim, J. M. und Gerzer, R. (1991): Isolation and expression of a guanylate cyclase-coupled heat stable enterotoxin receptor cDNA from a human colonic cell line. *Biochem.Biophys.Res Commun.*, **179**, 1455-1463.
- Sixma, T. K., Pronk, S. E., Kalk, K. H., van Zanten, B. A., Berghuis, A. M. und Hol, W. G. (1992): Lactose binding to heat-labile enterotoxin revealed by X-ray crystallography. *Nature*, **355**, 561-564.
- Skelton, N. J., Garcia, K. C., Goeddel, D. V., Quan, C. und Burnier, J. P. (1994): Determination of the solution structure of the peptide hormone guanylin: observation of a novel form of topological stereoisomerism. *Biochemistry*, **33**, 13581-13592.
- Sklenar, V., Piotto, M., Leppik, R. und Saudek, V. (1993): Gradient-Tailored Water Suppression for ^1H - ^{15}N HSQC Experiments Optimized to Retain Full Sensitivity. *J.Magn.Reson., Series A*, **102**, 241-245.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. und Klenk, D. C. (1985): Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal.Biochem.*, **150**, 76-85.
- Sreerama, N. und Woody, R. W. (1993): A self-consistent method for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism. *Anal.Biochem.*, **209**, 32-44.
- Stewart, E. J., Aslund, F. und Beckwith, J. (1998): Disulfide bond formation in the *Escherichia coli* cytoplasm: an in vivo role reversal for the thioredoxins. *EMBO J.*, **17**, 5543-5550.
- Talluri, S. und Wagner, G. (1996): An Optimized 3D NOESY-HSQC. *J.Magn.Reson., Series B*, **112**, 200-205.
- Thomas, M. R. (1994): Simple, effective cleanup of DNA ligation reactions prior to electrotransformation of *E. coli*. *Biotechniques*, **16**, 988-990.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. und Gibson, T. J. (1994): CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*, **22**, 4673-4680.
- Tidten, N. (2003): Klonierung und Charakterisierung von miniGC-C, einem Fragment der extrazellulären Domäne der Guanylatzyklase-C. Diplomarbeit, Lehrstuhl für Struktur und

Chemie der Biopolymere, Universität Bayreuth.

- Tjandra, N. und Bax, A. (1997): Direct measurement of distances and angles in biomolecules by NMR in a dilute liquid crystalline medium. *Science*, **278**, 1111-1114.
- Toy-Palmer, A., Prytulla, S. und Dyson, H. J. (1995): Complete ^{13}C assignments for recombinant Cu(I) rusticyanin. Prediction of secondary structure from patterns of chemical shifts. *FEBS Lett.*, **365**, 35-41.
- Vaandrager, A. B., van der, W. E. und de Jonge, H. R. (1993): Heat-stable enterotoxin activation of immunopurified guanylyl cyclase C. Modulation by adenine nucleotides. *J.Biol.Chem.*, **268**, 19598-19603.
- Vaandrager, A. B., van der, W. E., Hom, M. L., Luthjens, L. H. und de Jonge, H. R. (1994): Heat-stable enterotoxin receptor/guanylyl cyclase C is an oligomer consisting of functionally distinct subunits, which are non-covalently linked in the intestine. *J.Biol.Chem.*, **269**, 16409-16415.
- Vaandrager, A. B., Tilly, B. C., Smolenski, A., Schneider-Rasp, S., Bot, A. G., Edixhoven, M., Scholte, B. J., Jarchau, T., Walter, U., Lohmann, S. M., Poller, W. C. und de Jonge, H. R. (1997a): cGMP stimulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl-channels co-expressed with cGMP-dependent protein kinase type II but not type I beta. *J.Biol.Chem.*, **272**, 4195-4200.
- Vaandrager, A. B., Bot, A. G. und de Jonge, H. R. (1997b): Guanosine 3',5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase II mediates heat-stable enterotoxin-provoked chloride secretion in rat intestine. *Gastroenterology*, **112**, 437-443.
- Vaandrager, A. B. (2002): Structure and function of the heat-stable enterotoxin receptor/guanylyl cyclase C. *Mol.Cell.Biochem.*, **230**, 73-83.
- van den Akker, F., Zhang, X., Miyagi, M., Huo, X., Misono, K. S. und Yee, V. C. (2000): Structure of the dimerized hormone-binding domain of a guanylyl-cyclase- coupled receptor. *Nature*, **406**, 101-104.
- van den Akker, F. (2001): Structural insights into the ligand binding domains of membrane bound guanylyl cyclases and natriuretic peptide receptors. *J.Mol.Biol.*, **311**, 923-937.
- van Holde, K. E., Johnson, W. C. und Ho, P. S. (1998a): Principles of Physical Biochemistry. Kapitel: Macromolecules in Solution: Thermodynamics and Equilibria. Prentice Hall, London, 528-563.

- van Holde, K. E., Johnson, W. C. und Ho, P. S. (1998b): Principles in Physical Biochemistry. Kapitel: Thermodynamic and Transport Processes. Prentice Hall, London, 564-586.
- Vijayachandra, K., Guruprasad, M., Bhandari, R., Manjunath, U. H., Somesh, B. P., Srinivasan, N., Suguna, K. und Visweswariah, S. S. (2000): Biochemical characterization of the intracellular domain of the human guanylyl cyclase C receptor provides evidence for a catalytically active homotrimer. *Biochemistry*, **39**, 16075-16083.
- Vuister, G. W. und Bax, A. (1993): Quantitative J correlation: a new approach for measuring homonuclear three-bond $J(\text{H}^{\text{N}}-\text{H}^{\alpha})$ coupling constants in ^{15}N -enriched proteins. *J.Am.Chem.Soc.*, **115**, 7772-7777.
- Wada, A., Hirayama, T., Kitaura, H., Fujisawa, J., Hasegawa, M., Hidaka, Y. und Shimonishi, Y. (1996a): Identification of ligand recognition sites in heat-stable enterotoxin receptor, membrane-associated guanylyl cyclase C by site-directed mutational analysis. *Infect.Immun.*, **64**, 5144-5150.
- Wada, A., Hasegawa, M., Matsumoto, K., Niidome, T., Kawano, Y., Hidaka, Y., Padilla, P. I., Kurazono, H., Shimonishi, Y. und Hirayama, T. (1996b): The significance of Ser1029 of the heat-stable enterotoxin receptor (STaR): relation of STa-mediated guanylyl cyclase activation and signaling by phorbol myristate acetate. *FEBS Lett.*, **384**, 75-77.
- Wedel, B. J. und Garbers, D. L. (1998): Guanylyl Cyclases: Approaching Year Thirty. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, **9**, 213-219.
- WHO Facts Sheets (1996): No. **109**.
- Wiegand, R. C., Kato, J., Huang, M. D., Fok, K. F., Kachur, J. F. und Currie, M. G. (1992): Human guanylin: cDNA isolation, structure, and activity. *FEBS Lett.*, **311**, 150-154.
- Wishart, D. S., Sykes, B. D. und Richards, F. M. (1991): Relationship between nuclear magnetic resonance chemical shift and protein secondary structure. *J.Mol.Biol.*, **222**, 311-333.
- Wishart, D. S., Sykes, B. D. und Richards, F. M. (1992): The chemical shift index: a fast and simple method for the assignment of protein secondary structure through NMR spectroscopy. *Biochemistry*, **31**, 1647-1651.
- Wishart, D. S., Bigam, C. G., Holm, A., Hodges, R. S. und Sykes, B. D. (1995): ^1H , ^{13}C and ^{15}N random coil NMR chemical shifts of the common amino acids. I. Investigations of nearest-neighbor effects. *J.Biomol.NMR*, **5**, 67-81.

- Wüthrich, K. (1986): NMR of proteins and nucleic acids. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Yoshimura, S., Ikemura, H., Watanabe, H., Aimoto, S., Shimonishi, Y., Hara, S., Takeda, T., Miwatani, T. und Takeda, Y. (1985): Essential structure for full enterotoxigenic activity of heat-stable enterotoxin produced by enterotoxigenic *Escherichia coli*. *FEBS Lett.*, **181**, 138-142.
- Zhang, O., Kay, L. E., Olivier, J. P. und Forman-Kay, J. D. (1990): Backbone ^1H and ^{15}N resonance assignments of the N-terminal SH3 domain of drk in folded and unfolded states using enhanced-sensitivity pulsed field gradient NMR techniques. *J.Biomol.NMR*, **4**, 845-858.
- Zhang, W., Smithgall, T. und Gmeiner, W. H. (1997): Three-dimensional structure of the Hck SH2 domain in solution. *J.Biomol.NMR*, **10**, 263-272.
- Zhu, G. und Bax, A. (1990): Improved linear prediction of truncated signals of known phase. *J.Magn.Reson.*, **90**, 405-410.
- Zwahlen, C., Legault, P., Vincent, S. J. F., Greenblatt, J., Konrat, R. und Kay, L. E. (1997): Methods for Measurement of Intermolecular NOEs by Multinuclear NMR Spectroscopy: Application to a Bacteriophage λ N-Peptide/*boxB* RNA Complex. *J.Am.Chem.Soc.*, **119**, 6711-6721.

10.2 Eigene Publikationen

- Lauber, T., Marx, U. C., Schulz, A., Kreutzmann, P., Rösch, P. und Hoffmann, S. (2001): Accurate disulfide formation in *Escherichia coli*: overexpression and characterization of the first domain (HF6478) of the multiple Kazal-type inhibitor LEKTI. *Protein Expr.Purif.*, **22**, 108-112.
- Lauber, T., Nourse, A., Schulz, A. und Marx, U. C. (2002): Native and Recombinant Proguanylin Feature Identical Biophysical Properties and Are Monomeric in Solution. *Biochemistry*, **41**, 14602-14612.
- Lauber, T., Neudecker, P., Rösch, P. und Marx, U. C. (2003): Solution structure of human proguanylin: The role of a hormone prosequence. *J.Biol.Chem.*, **278**, 24118-24124.
- Lauber, T., Schulz, A., Schweimer, K., Adermann, K. und Marx, U. C. (2003): Homologous Proteins with Different Folds: The Three-Dimensional Structures of Domains 1 and 6 of the Multiple Kazal-Tye Inhibitor LEKTI. *J.Mol.Biol.*, **328**, 205-219.

11. Anhang

11.1 Nukleotidsequenzen

Über den Nukleotidsequenzen sind die jeweils verwendeten Restriktionsschnittstellen, darunter ist die entsprechende Aminosäuresequenz angegeben. Dabei ist die Aminosäuresequenz des rekombinanten Proteins dunkelgrau hinterlegt, die jeweilige Erkennungssequenz für die Proteinasen PreScission, Enterokinase und Faktor Xa sind jeweils hellgrau hervorgehoben und die Sequenz des erstmals isolierten Peptidhormons Guanylin ist schwarz unterlegt (nur bei den Proguanylin-Klonen).

11.1.1 Nukleotidsequenz von pBlueKS-miniGC-C

XbaI BglII

```

      |      |
1  ATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGAGCTCCACCGCGGTGGCGGCCGCTCTAGAAGATC 60
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   TATGCTGAGTGATATCCCGCTTAACCTCGAGGTGGCGCCACCGCCGGCGAGATCTTCTAG
c      T  T  H  Y  R  A  N  W  S  S  T  A  V  A  A  A  L  E  D  L  -

61  TGGGTCTGGAAGTTCTGTTCCAGGGGCCCTCTCCAGCAAGGAAGCTGATGTACTTCTTGG 120
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   ACCCAGACCTTCAAGACAAGGTCCCGGGAGAGGTCGTTCTTCGACTACATGAAGAACC
c      G  L  E  V  L  F  Q  G  P  S  P  A  R  K  L  M  Y  F  L  V  -

121  TTGACTTTTGGAAAGGTCAATAATTTTCCATTCAAACCTTTTTCCTGGAACACTGCCTATG 180
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   AACTGAAAACCTTCCAGTTATTAAAAGGTAAGTTTGGAAAAAGGACCTTGTGACGGATAC
c      D  F  W  K  V  N  N  F  P  F  K  P  F  S  W  N  T  A  Y  V  -

181  TTTTCAAGAATAGTACAGAGTCTGAGGACTGTTTCTGGTACCTCAATGCTCTGGAGGCTG 240
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   AAAAGTTCTTATCATGTCTCAGACTCCTGACAAAGACCATGGAGTTACGAGACCTCCGAC
c      F  K  N  S  T  E  S  E  D  C  F  W  Y  L  N  A  L  E  A  G  -

241  GAGTTTCCTATTTTCTCAGAACTTAGCTTCAAGGAGATGCTGAGAGGAAATGAGGAGT 300
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   CTCAAAGGATAAAAAAGAGTCTTTGAATCGAAGTTCCCTCTACGACTCTCCTTTACTCTCA
c      V  S  Y  F  S  Q  K  L  S  F  K  E  M  L  R  G  N  E  E  F  -

301  TTCAGAATATCTTAATGGACCAGAACAGGAAAAAGCAATGTCATTATTATGTGTGGTGCAC 360
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   AAGTCTTATAGAATTACCTGGTCTTGTCCCTTTTCGTTACAGTAATAATACACACCACGTG
c      Q  N  I  L  M  D  Q  N  R  K  S  N  V  I  I  M  C  G  A  P  -

361  CAGAAACCGTCCACACCCCTCAAGGGTGGCCGGGCAGTGGCTGAAGACACCGTCATTATTC 420
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   GTCTTTGGCAGGTGTGGGAGTTCCCACCGGCCCGTCAACCGACTTCTGTGGCAGTAATAAG
c      E  T  V  H  T  L  K  G  G  R  A  V  A  E  D  T  V  I  I  L  -

```


11.1.2 Nukleotidsequenz von pET-32a-EK-proguanylin

```

121 TGGTTCTGGCCATATGCACCATCATCATCATCATTCTTCTGGTCTGGTGCCACGCGGTTCT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
ACCAAGACCGGTATACGTGGTAGTAGTAGTAAGAAGACCAGACCACGGTGCGCCAAG

b      G   S   G   H   M   H   H   H   H   H   S   S   G   L   V   P   R   G   S   -

                                           BglIII
                                           |
181 TGGTATGAAAAGAAAACCGCTGCTGCTAAATTTCGAACGCCAGCACATGGACAGCCCAGATCT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
ACCATACTTTCTTTGGCGACGACGATTTAAGCTTGCGGTCGTGTACCTGTCGGGTCTAGA

b      G   M   K   E   T   A   A   A   K   F   E   R   Q   H   M   D   S   P   D   L   -

241 GGGCGACGACGACGACACAAGGTCACCGTGCAGGATGGAAAATTTCTCCTTTTCTCTGGAGTC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
CCCCTGCTGCTGCTGCTGTTCCAGTGGCACGTCTACCTTTAAAGAGGAAAAGAGACCTCAG

b      G   D   D   D   D   K   V   T   V   Q   D   G   N   F   S   F   S   L   E   S   -

301 AGTGAAGAAGCTCAAAGACCTCCAGGAGCCCCAGGAGCCCAGGGTTGGGAAACTCAGGAA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
TCACTTCTTCGAGTTTCTGGAGGTCCTCGGGGTCTCGGGTCCCAACCCTTTGAGTCCTT

b      V   K   K   L   K   D   L   Q   E   P   Q   E   P   R   V   G   K   L   R   N   -

361 CTTTGCACCCATCCCTGGTGAACCTGTGGTTCCCATCCTCTGTAGCAACCCGAACTTTCC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
GAAACGTGGGTAGGGACCACTTGGACACCAAGGTTAGGAGACATCGTTGGGCTTGAAAGG

b      F   A   P   I   P   G   E   P   V   V   P   I   L   C   S   N   P   N   F   P   -

421 AGAAGAACTCAAGCCTCTCTGCAAGGAGCCCAATGCCCAGGAGATACTTCAGAGGCTGGA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
TCTTCTTGAGTTTCGGAGAGACGTTTCCTCGGGTTACGGGTCTCTATGAAGTCTCCGACCT

b      E   E   L   K   P   L   C   K   E   P   N   A   Q   E   I   L   Q   R   L   E   -

481 GGAAATCGCTGAGGACCCGGGCACATGTGAAATCTGTGCCTACGCTGCCTGTACCGGATG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
CCTTTAGCGACTCCTGGGCCCCGTGTACACTTTAGACACGGATGCGACGGACATGGCCTAC

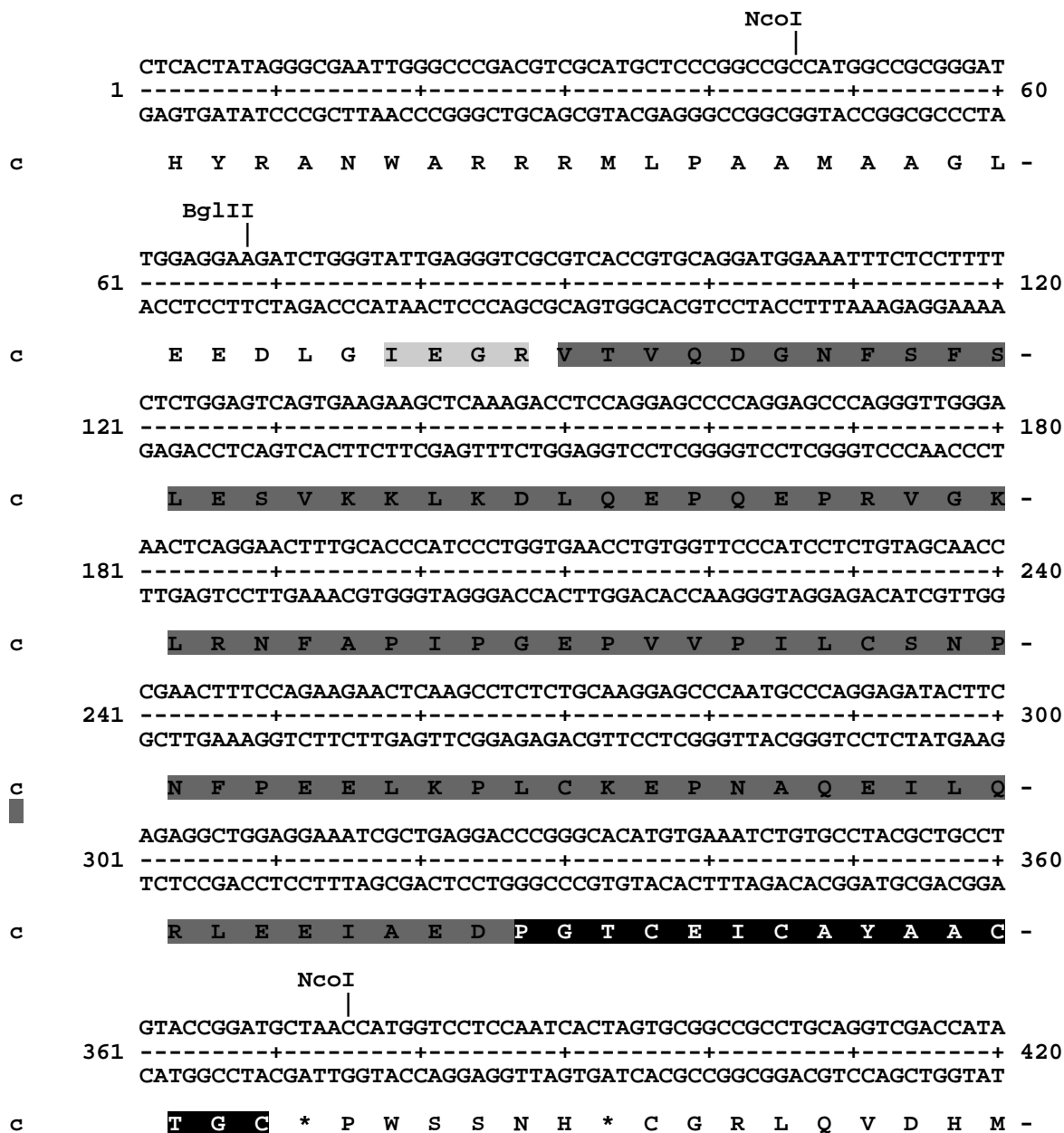
b      E   I   A   E   D   P   G   T   C   E   I   C   A   Y   A   A   C   T   G   C   -

NcoI
|
541 CTAACCATGGCTGATATCGGATCCGAATTCGAGCTCCGTCGACAAGCTTGCGGCCGCACT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600
GATTGGTACCGACTATAGCCTAGGCTTAAGCTCGAGGCAGCTGTTCAACGCCGGCGTGA

b      *   P   W   L   I   S   D   P   N   S   S   S   V   D   K   L   A   A   A   L   -

```

11.1.3 Nukleotidsequenz von pGEM-T-Xa-*proguanylin*



Die Klonierung in pET-32a erfolgte über die *Bgl*II- und *Nco*I-Schnittstellen.

11.1.4 Nukleotidsequenz von pET-32a-pres-proguanylin

```

TATGCACCATCATCATCATCATTCTTCTGGTCTGGTGCCACGCGGTTCTGGTATGAAAGA
61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
ATACGTGGTAGTAGTAGTAGTAAGAAGACCAGACCACGGTGCGCCAAGACCATACTTTCT

b      M  H  H  H  H  H  H  S  S  G  L  V  P  R  G  S  G  M  K  E  -

                                     BglIII
                                     |
AACCGCTGCTGCTAAATTTCGAACGCCAGCACATGGACAGCCAGATCTGGGTCTGGAAGT
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
TTGGCGACGACGATTTAAGCTTGCGGTCGTGTACCTGTCGGGTCTAGACCCAGACCTTCA

b      T  A  A  A  K  F  E  R  Q  H  M  D  S  P  D  L  G  L  E  V  -

TCTGTTCCAGGGGCCCCGTCACCGTGCAGGATGGAAAATTTCTCTTTTCTCTGGAGTCAGT
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
AGACAAGGTCCCCGGGCAGTGGCACGTCTACCTTTAAAGAGGAAAAGAGACCTCAGTCA

b      L  F  Q  G  P  V  T  V  Q  D  G  N  F  S  F  S  L  E  S  V  -

GAAGAAGCTCAAAGACCTCCAGGAGCCCCAGGAGCCCAGGGTTGGGAAACTCAGGAACTT
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
CTTCTTCGAGTTTCTGGAGGTCTCTCGGGTCTCTCGGGTCCCAACCCTTTGAGTCCTTGAA

b      K  K  L  K  D  L  Q  E  P  Q  E  P  R  V  G  K  L  R  N  F  -

TGCACCCATCCCTGGTGAACCTGTGGTTCCCATCCTCTGTAGCAACCCGAACCTTTCCAGA
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
ACGTGGGTAGGGACCACTTGGACACCAAGGTTAGGAGACATCGTTGGGCTTGAAAGGTCT

b      A  P  I  P  G  E  P  V  V  P  I  L  C  S  N  P  N  F  P  E  -

AGAACTCAAGCCTCTCTGCAAGGAGCCCAATGCCAGGAGATACTTCAGAGGCTGGAGGA
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
TCTTGAGTTCGGAGAGACGTTCTCTCGGGTTACGGGTCTCTATGAAGTCTCCGACCTCCT

b      E  L  K  P  L  C  K  E  P  N  A  Q  E  I  L  Q  R  L  E  E  -

AATCGCTGAGGACCCGGGCACATGTGAAATCTGTGCCTACGCTGCCTGTACCGGATGCTA
421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
TTAGCGACTCCTGGGCCCCGTGTACACTTTAGACACGGATGCGACGGACATGGCCTACGAT

b      I  A  E  D  P  G  T  C  E  I  C  A  Y  A  A  C  T  G  C  *  -

NcoI
|
ACCATGGCTGATATCGGATCCGAATTCGAGCTCCGTCGACAAGCTTGCGGCCGCACTCGA
481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
TGGTACCGACTATAGCCTAGGCTTAAGCTCGAGGCAGCTGTTTGAACGCCGGCGTGAGCT

b      P  W  L  I  S  D  P  N  S  S  S  V  D  K  L  A  A  A  L  E  -

```

GAAAGAGTTCTCTCGACGCTAAACCTGGCGGTTCTGGTTCGGCCATATGCACCATCATCA
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
 CTTTCTCAAGGAGCTGCGATTGGACCGGCCAAGACCAAGACCGGTATACGTGGTAGTAGT

 K E F L D A N L A G S G S G H M H H H H -
 TCATCATTCTTCTGGTCTGGTGCCACGCGTTCTGGTATGAAAGAAACCGCTGCTGCTAA
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
 AGTAGTAAGAAGACCAGACCACGGTGCGCCAAGACCATACTTTCTTTGGCGACGACGATT

 H H S S G L V P R G S G M K E T A A A K -

 BglIII
 |
 ATTCGAACGCCAGCACATGGACAGCCCAGATCTGGGTGACGACGACGACGACCTGGAAGT
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
 TAAGCTTGCGGTCGTGTACCTGTCTGGGTCTAGACCCACTGCTGCTGCTGCTGACCTTCA

 F E R Q H M D S P D L G D D D D D L E V -
 TCTGTTCCAGGGGCCCCGTACCGTGCAGGATGGAAATTTCTCTTTTCTCTGGAGTCAGT
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
 AGACAAGGTCCCCGGGCAGTGGCACGTCCTACCTTTAAAGAGGAAAAGAGACCTCAGTCA

 L F Q G P V T V Q D G N F S F S L E S V -
 GAAGAAGCTCAAAGACCTCCAGGAGCCCCAGGAGCCCAGGGTTGGGAAACTCAGGAACTT
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
 CTTCTTCGAGTTTCTGAGAGTCTCTCGGGTCTCTCGGGTCCCAACCTTTGAGTCCTTGAA

 K K L K D L Q E P Q E P R V G K L R N F -
 TGCACCCATCCCTGGTGAACCTGTGGTTCCTATCCTCTGTAGCAACCCGAACCTTTCCAGA
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
 ACGTGGGTAGGGACCACTTGGACACCAAGGGTAGGAGACATCGTTGGGCTTGAAAGGTCT

 A P I P G E P V V P I L C S N P N F P E -
 AGAACTCAAGCCTCTCTGCAAGGAGCCCCAATGCCAGGAGATACTTCAGAGGCTGGAGGA
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
 TCTTGAGTTTCGGAGAGACGTTCTCTCGGGTTACGGGTCTCTATGAAGTCTCCGACCTCT

 E L K P L C K E P N A Q E I L Q R L E E -
 AATCGCTGAGGACCCGGGCACATGTGAAATCTGTGCCTACGCTGCCTGTACCGGATGCTA
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
 TTAGCGACTCCTGGGCCCCGTGTACACTTTAGACACGGATGCGACGGACATGGCCTACGAT

 I A E D P G T C E I C A Y A A C T G C * -
 coI
 |
 ACCATGGCTGATATCGGATCCGAATTCGAGCTCCGTCGACAAGCTTGCGGCCGCACTCGA
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
 TGGTACCGACTATAGCCTAGGCTTAAGCTCGAGGCAGCTGTTCGAACGCCGGCGTGAGCT

 P W L I S D P N S S S V D K L A A A L E -

Die zusätzlich eingeführten Aspartatreste sind ebenfalls farblich hervorgehoben.

11.1.6 Nukleotidsequenz von pET-32a-pres-*proguanylin*- $\Delta(28-37)$

```

TCTGGTTCTGGCCATATGCACCATCATCATCATCATTCTTCTGGTCTGGTGCCACGCGGT
61  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
AGACCAAGACCGGTATACGTGGTAGTAGTAGTAAGAAGACCAGACCACGGTGCGCCA

a      S  G  S  G  H  M  H  H  H  H  H  S  S  G  L  V  P  R  G  -

                                     BglIII
                                     |
TCTGGTATGAAAAGAAACCGCTGCTGCTAAATTCGAACGCCAGCACATGGACAGCCCAGAT
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
AGACCATACTTTCTTTGGCGACGACGATTTAAGCTTGCGGTCGTGTACCTGTCGGGTCTA

a      S  G  M  K  E  T  A  A  A  K  F  E  R  Q  H  M  D  S  P  D  -

CTGGGTGACGACGACGACGACCTGGAAGTTCTGTTCCAGGGGCCCCGTCACCGTGCAGGAT
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
GACCCACTGCTGCTGCTGCTGGACCTTCAAGACAAGGTCCCCGGGCAGTGGCAGTCTCCTA

a      L  G  D  D  D  D  D  L  E  V  L  F  Q  G  P  V  T  V  Q  D  -

GGAAAATTTCTCCTTTTCTCTGGAGTCAGTGAAGAAGCTCAAAGACCTCCAGGAGCCCCAG
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
CCTTTAAAGAGGAAAAGAGACCTCAGTCACTTCTTCGAGTTTCTGGAGGTCCTCGGGGTC

a      G  N  F  S  F  S  L  E  S  V  K  K  L  K  D  L  Q  E  P  Q  -

GAGCCCATCCCTGGTGAACCTGTGGTTCCCATCCTCTGTAGCAACCCGAACTTTCCAGAA
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
CTCGGGTAGGGACCACTTGACACCAAGGGTAGGAGACATCGTTGGGCTTGAAAGTCTT

a      E  P  I  P  G  E  P  V  V  P  I  L  C  S  N  P  N  F  P  E  -

GAACTCAAGCCTCTCTGCAAGGAGCCCAATGCCCAGGAGATACTTCAGAGGCTGGAGGAA
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
CTTGAGTTCGGAGAGACGTTCTCGGGTTACGGGTCCTCTATGAAGTCTCCGACCTCCTT

a      E  L  K  P  L  C  K  E  P  N  A  Q  E  I  L  Q  R  L  E  E  -

ATCGCTGAGGACCCGGGCACATGTGAAATCTGTGCCTACGCTGCCTGTACCGGATGCTAA
421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
TAGCGACTCCTGGGCCCCGTGTACACTTTAGACACGGATGCGACGGACATGGCCTACGATT

a      I  A  E  D  P  G  T  C  E  I  C  A  Y  A  A  C  T  G  C  *  -

NcoI
|
CCATGGCTGATATCGGATCCGAATTCGAGCTCCGTCGACAAGCTTGCGGCCGCACTCGAG
481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
GGTACCGACTATAGCCTAGGCTTAAGCTCGAGGCAGCTGTTTGAACGCCGGCGTGAGCTC

a      P  W  L  I  S  D  P  N  S  S  S  V  D  K  L  A  A  A  L  E  -

```

11.1.7 Nukleotidsequenz von pET-32a-pres-*proguanylin-c48s/c61s*

	AAAGAGTTCCTCGACGCTAACCTGGCCGGTTCCTGGTTCCTGGCCATATGCACCATCATCAT	1	-----+-----+-----+-----+-----+ 60
	TTTCTCAAGGAGCTGCGATTGGACCGGCCAAGACCAAGACCGGTATACGTGGTAGTAGTA		
a	K E F L D A N L A G S G S G H M H H H H -		
	CATCATTCCTTCTGGTCTGGTGCCACGCGGTTCCTGGTATGAAAGAAACCGCTGCTGCTAAA	61	-----+-----+-----+-----+-----+ 120
	GTAGTAAGAAGACCAGACCACGGTGCGCCAAGACCATACTTTCTTTGGCGACGACGATTT		
a	H H S S G L V P R G S G M K E T A A A K -		
	BglII		
	TTCGAACGCCAGCACATGGACAGCCCAGATCTGGGTGACGACGACGACGACCTGGAAGTT	121	-----+-----+-----+-----+-----+ 180
	AAGCTTGCGGTCTGTACCTGTCTGGGTCTAGACCCACTGCTGCTGCTGCTGGACCTTCAA		
a	F E R Q H M D S P D L G D D D D D L E V -		
	CTGTTCCAGGGGCCCCGTACCGTGCAGGATGGAAATTTCTCCTTTTCTCTGGAGTCAGTG	181	-----+-----+-----+-----+-----+ 240
	GACAAGGTCCCCGGGCAGTGGCACGTCTTACCTTTAAAGAGGAAAAGAGACCTCAGTCAC		
a	L F Q G P V T V Q D G N F S F S L E S V -		
	AAGAAGCTCAAAGACCTCCAGGAGCCCCAGGAGCCCAGGGTTGGGAAACTCAGGAACCTTT	241	-----+-----+-----+-----+-----+ 300
	TTCTTCGAGTTTCTGGAGGTCCTCGGGTCTCTCGGGTCCCAACCCTTTGAGTCCTTGAAA		
a	K K L K D L Q E P Q E P R V G K L R N F -		
	GCACCCATCCCTGGTGAACCTGTGGTTCCTCATCCTCAGCAGCAACCCGAACCTTCCAGAA	301	-----+-----+-----+-----+-----+ 360
	CGTGGGTAGGGACCACCTTGGACACCAAGGGTAGGAGTCGTCTGTTGGGCTTGAAAGGTCTT		
a	A P I P G E P V V P I L S S N P N F P E -		
	GAACTCAAGCCTCTCAGCAAGGAGCCCCAATGCCAGGAGATACTTCAGAGGCTGGAGGAA	361	-----+-----+-----+-----+-----+ 420
	CTTGAGTTCGGAGAGTCGTTCTCGGGTTACGGGTCTCTATGAAGTCTCCGACCTCCTT		
a	E L K P L S K E P N A Q E I L Q R L E E -		
	ATCGCTGAGGACCCGGGCACATGTGAAATCTGTGCCTACGCTGCCTGTACCGGATGCTAA	421	-----+-----+-----+-----+-----+ 480
	TAGCGACTCTGGGCCCGTGTACACTTTAGACACGGATGCGACGGACATGGCCTACGATT		
a	I A E D P G T C E I C A Y A A C T G C * -		
	NcoI		
	CCATGGCTGATATCGGATCCGAATTCGAGCTCCGTCGACAAGCTTGCGGCCGCACTCGAG	481	-----+-----+-----+-----+-----+ 540
	GGTACCGACTATAGCCTAGGCTTAAGCTCGAGGCAGCTGTTCGAACGCCGGCGTGAGCTC		
a	P W L I S D P N S S S V D K L A A A L E -		

Die durch Serin substituierten Cysteinreste 48 und 61 sind hellgrau unterlegt.

CCATCATCATCATCATCTTCTTCTGGTCTGGTGGCCACGCGGTTCTGGTATGAAAGAAACCGT
61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
GGTAGTAGTAGTAGTAAGAAGACCAGACCACGGTGCGCCAAGACCATACTTTCTTTGGCA

b H H H H H S S G L V P R G S G M K E T V -

BglII
|

TGCTGCTAAATTCGAACGCCAGCACATGGACAGCCCAGATCTGGGTGACGACGACGACGA
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
ACGACGATTTAAGCTTGCGGTTCGTGTACCTGTCGGGTCTAGACCCACTGCTGCTGCTGCT

b A A K F E R Q H M D S P D L G D D D D D -

CCTGGAAGTTCTGTTCCAGGGGCCCCGTCACCGTGCAGGATGGAAATTTCTCCTTTTCTCT
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
GGACCTTCAAGACAAGGTCCCCGGGCAGTGGCACGTCCCTACCTTTAAAGAGGAAAAGAGA

b L E V L F Q G P V T V Q D G N F S F S L -

GGAGTCAGTGAAGAAGCTCAAAGACCTCCAGGAGCCCCAGGAGCCCAGGGTTGGGAAACT
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
CCTCAGTCACTTCTTCGAGTTTCTGGAGGTCCTCGGGGTCCTCGGGTCCCAACCCTTTGA

b E S V K K L K D L Q E P Q E P R V G K L -

CAGGAACTTTGCACCCATCCCTGGTGAACCTGTGGTTCCCATCCTCTGTAGCAACCCGAA
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
GTCCTTGAAACGTGGGTAGGGACCCTTGGACACCAAGGGTAGGAGACATCGTTGGGCTT

b R N F A P I P G E P V V P I L C S N P N -

CTTTCAGAAAGAACTCAAGCCTCTCTGCAAGGAGCCCAATGCCCAGGAGATACTTCAGAG
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
GAAAGGTCTTCTTGAGTTTCGGAGAGACGTTCTCGGGTTACGGGTCCTCTATGAAGTCTC

b F P E E L K P L C K E P N A Q E I L Q R -

GCTGGAGGAAATCGCTGAGGACCCGGGCACATGTGAAATCAGCGCCTACGCTGCCTGTAC
421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
CGACCTCCTTTAGCGACTCCTGGGCCCCGTGTACACTTTAGTCGCGGATGCGACGGACATG

b L E E I A E D P G T C E I S A Y A A C T -

NcoI
|

CGGAAGCTAACCATGGCTGATATCGGATCCGAATTCGAGCTCCGTCGACAAGCTTGCGGC
481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
GCCTTCGATTGGTACCGACTATAGCCTAGGCTTAAGCTCGAGGCAGCTGTTTCAACGCCG

b G S * P W L I S D P N S S S V D K L A A -

Die durch Serin substituierten Cysteinreste 86 und 94 sind hellgrau unterlegt.

11.2 XPLOR-Protokolle

11.2.1 progua_psf.inp: Protokoll zum Erstellen der Strukturdatei progua.psf

```

topology
@/usr/local/source/xplor/toppar/topallhdg.pro
end          { Read topology file }

segment      { Generate protein
name="      " { This name has to match the
               { four characters in columns 73
               { through 76 in the coordinate
               { file, in XPLOR this name is
               { name is referred to as SEGId. }

chain
@/usr/local/source/xplor/toppar/tophl9.pep      { Read peptide bond file }

SEQUENCE
VAL THR VAL GLN ASP GLY ASN PHE SER PHE SER LEU GLU SER VAL LYS LYS LEU LYS
ASP LEU GLN GLU PRO GLN GLU PRO ARG VAL GLY LYS LEU ARG ASN PHE ALA PRO ILE
PRO GLY GLU PRO VAL VAL PRO ILE LEU CYS SER ASN PRO ASN PHE PRO GLU GLU LEU
LYS PRO LEU CYS LYS GLU PRO ASN ALA GLN GLU ILE LEU GLN ARG LEU GLU GLU ILE
ALA GLU ASP PRO GLY THR CYS GLU ILE CYS ALA TYR ALA ALA CYS THR GLY CYS

END
end          { obtain the sequence }
end

PATCH DISU REFERENCE=1=(RESID 48) REFERENCE=2=(RESID 61) END
PATCH DISU REFERENCE=1=(RESID 83) REFERENCE=2=(RESID 91) END
PATCH DISU REFERENCE=1=(RESID 86) REFERENCE=2=(RESID 94) END

write structure output=progua.psf end

stop

```

11.2.2 srg3grid_55_40_.inp: *grid search* Protokoll zur Bestimmung der Tensorkomponenten

```

remarks sa_l.inp
remarks Author: Michael Nilges

evaluate ($ini_count = 0)
evaluate ($end_count = 20)

evaluate ($iniseed = 100046)
evaluate ($iniseed2 = 554321) !changed HS

evaluate ($init_t = 1000 ) { * initial simulated annealing temperature *}
evaluate ($high_steps = 5000) !50000
evaluate ($cool_steps = 10000) !50000

evaluate ($fileroot = "../srg3GRID_55_40/progua_55_40_")
!evaluate ($reference = "il8_n.pdb")
evaluate ($template = "../..//struktur/srgauss_3/rnk_progua_151002_1.pdb")

structure @@../INPUT/progua.psf end
structure @../INPUT/axis_hs.psf end

parameter @@../INPUT/parallhdg.hs end
param @../para_axis_3.pro end

parameter nbfix S S 462 13.6 462 13.6 end
parameter
bond (name sg) (name sg) 0.0 TOKEN
angle (all) (name sg) (name sg) 0.0 TOKEN
end

coor @@$template

```

```

    coor @./axis.pdb

    coor copy end

noe
    reset
    nrestraints = 5000                ! allocate space for NOEs

    class      dist
        @../input/noes_220702.sequentialnoes
        @../input/noes_120702.mediumnoes
        @../input/noes_220702.longnoes
        @../input/progua_280602.xplorNOE
        @../input/progua_300902.h_bonds
        @../input/c_noes_130502.sequentialnoes
        @../input/c_noes_280602.mediumnoes
        @../input/c_noes_130502.longnoes

    set echo on message on end

    ceiling=1000
    averaging * sum
    potential * square
    scale      * 50.
    sqoffset   * 0.0
    sqconstant * 1.0
    sqexponent * 2
    rswitch    * 0.5

end

restraints dihedral
    nassign=1000
    @../input/jcouple_xplor
    @../input/2d_jcouple_xplor

end

noe
assign (resid      48 and      name SG)(resid  61 and      name SG)  2.02 0.1 0.1
assign (resid      83 and      name SG)(resid  91 and      name SG)  2.02 0.1 0.1
assign (resid      86 and      name SG)(resid  94 and      name SG)  2.02 0.1 0.1
end

evaluate ($ksani = 0.01)
sani
    nres=400
    class JNH
    force $ksani
    potential harmonic
    coeff 0.0 5.50 0.40
    @../INPUT/progua_resdicoup.xplor

end

sani class JNH force 0 end

parameter                                     {*Parameters for the repulsive energy
term.*}
    nbonds
        repel=0.75                             {*Initial value for repel--modified
later.*}
        rexp=2 irexp=2 rcon=1.
        nbxmod=3
        wmin=0.01
        cutnb=4.5 ctonnb=2.99 ctofnb=3.
        tolerance=0.5
    end
end

```

```

restraints dihedral
    scale=5.
end

set echo off message off end

evaluate ($krama = 1.0)
evaluate ($ramacoff = 10.0)

rama
nres=10000
!set message off echo off end

@/raid1/sticht/TIP/MODEL_NEU/XPLOR/PROTOCOLS/gaussians/shortrange_gaussians
.tbl
@/raid1/sticht/TIP/MODEL_NEU/XPLOR/PROTOCOLS/gaussians/new_shortrange_force
.tbl

end

set message on echo on end
@/raid1/sticht/TIP/MODEL_NEU/XPLOR/PROTOCOLS/gaussians/newshortrange_setup.
tbl

flags exclude * include bonds angle impr vdw noe cdih coup rama sani harm
end

set echo on message on end

@setup_swap_orig.hs

vector ident (store2) (store1)
parameter
    improper (store2) (store2) (all) (all) 0.0 TOKEN TOKEN
    improper (all) (all) (store2) (store2) 0.0 TOKEN TOKEN
end

evaluate ($count = $ini_count)
while ($count < $end_count ) loop main

    evaluate ($count=$count+1)
    evaluate ($nreassign = 0)

    coor swap end
    coor copy end

    evaluate ($seed =$count*$iniseed)

if ($count > 60) then
    evaluate ($seed =($count-60)*$iniseed2)
end if

    set seed $seed end

    {*Friction coefficient for MD heatbath, in 1/ps. *}
vector do (fbeta=10) (all)
    {*Uniform heavy masses to speed molecular dynamics.*}

vector do (mass=100) (not (resid 500 or resid 600))
vector do (mass = 30.0) (resid 500 or resid 600)

! Fixing the axis using harmonic restraint
! leave out, let both rotate

vector do (refx=x) (all)
vector do (refy=y) (all)
vector do (refz=z) (all)

!vector do (harmonic=20.0) (resid 500 and name OO)

```

```

!vector do (harmonic=0.0) (resid 500 and name Z )
!vector do (harmonic=0.0) (resid 500 and name X )
!vector do (harmonic=0.0) (resid 500 and name Y )
!vector do (harmonic=0.0) (not (resid 500))
!restraints harmonic exponent=2 end
!flags include harm end

constraints fix ((resid 500 or resid 600) and name OO) end

!Original part from RNA-refinement protocol

vector do (vx=maxwell($init_t)) (all)
vector do (vy=maxwell($init_t)) (all)
vector do (vz=maxwell($init_t)) (all)

!swap adopted from Nilges Protocol

    evaluate ($swap = 1.001)
    flags exclude * include noe end
    @swap15v.xplor
    flags exclude * include bond angl impr vdw noe cdih coup rama sani harm
end

    restraints dihedral    scale=5.    end
    noe asymptote * 1.0    end

    constraints interaction
        (all) (all) weights * 1 end end

!    minimize powell nstep=500 drop=10.  nprint=25 end

{* ===== High-temperature dynamics.*}

    minimize powell nstep=500 drop=10.  nprint=25 end

    constraints interaction (all) (all)
        weights * 1    end end

eval ($init_kcdih=5)
eval ($end_kcdih=55)
eval ($cdihstep=10)
eval ($kcdih=-5)

eval ($ncycle=($end_kcdih-$kcdih)/$cdihstep)
eval ($nstep= int($high_steps/$ncycle))

eval ($i_cdih=0)
while ($i_cdih < $ncycle) loop cdih1
eval ($i_cdih = $i_cdih+1)
eval ($kcdih = $kcdih+$cdihstep)
restraints dihedral scale=$kcdih end

    dynamics verlet
        nstep=$nstep    timestep=0.0005    iasvel=current    firstt=$init_t
        tcoupling=true    tbath=$init_t    nprint=50    iprfrq=0
    end

end loop cdih1

constraints interaction (all) (all) weights * 1 end end

    restraints dihedral    scale=50.    end

    evaluate ($final_t = 300)    { K }

```

```

evaluate ($tempstep = 25)          { K }

evaluate ($ncycle = ($init_t-$final_t)/$tempstep)
evaluate ($nstep = int($cool_steps/$ncycle))

evaluate ($ini_rad = 0.9)          evaluate ($fin_rad = 0.75)
evaluate ($ini_con= 0.003)        evaluate ($fin_con= 4.0)

!inserted HS
evaluate ($ini_sani = 0.01)        evaluate ($fin_sani = 1.0)
evaluate ($sani_fac = ($fin_sani/$ini_sani)^(1/$ncycle))
evaluate ($ksani = $ini_sani)
sani class JNH force $ksani end

evaluate ($bath = $init_t)
evaluate ($k_vdw = $ini_con)
evaluate ($k_vdwfact = ($fin_con/$ini_con)^(1/$ncycle))
evaluate ($radius= $ini_rad)
evaluate ($radfact = ($fin_rad/$ini_rad)^(1/$ncycle))

evaluate ($i_cool = 0)
while ($i_cool < $ncycle) loop cool
  evaluate ($i_cool=$i_cool+1)

  evaluate ($bath = $bath - $tempstep)
  evaluate ($k_vdw=min($fin_con,$k_vdw*$k_vdwfact))
  evaluate ($radius=max($fin_rad,$radius*$radfact))

!inserted HS
evaluate ($ksani = $ksani*$sani_fac)
sani class JNH force $ksani end

parameter nbonds repel=$radius end end
constraints interaction (not name SG) (all)
  weights * 1. vdw $k_vdw end end

dynamics verlet
  nstep=$nstep time=0.0005 iasvel=current firstt=$bath
  tcoup=true tbath=$bath nprint=$nstep iprfrq=0
end
evaluate ($critical=$temp/$bath)
if ($critical > 10. ) then
  display ****&&&& rerun job with smaller timestep (i.e., 0.003)
  stop
end if

end loop cool

{* ===== Final minimization.*}

constraints interaction (all) (all) weights * 1. vdw 1. end end
parameter
  nbonds
    repel=0.75          !changed HS, original value 0.80
    rexp=2 irexp=2 rcon=1.
    nbxmod=3
    wmin=0.01
    cutnb=6.0 ctonnb=2.99 ctofnb=3.
    tolerance=1.5
  end
end

minimize powell nstep=200 drop=10.0 nprint=25 end

flags exclude * include bond angl impr vdw noe cdih coup sani harm end

minimize powell nstep=500 drop=10.0 nprint=25 end

flags exclude * include bond angl impr vdw noe cdih coup sani harm rama
end

sani class JNH force 0 end

```

```

{* 6 ===== write out the final structure(s)
*}

evaluate ($filename=$fileroot+ encode($count)+ ".pdb")
evaluate ($outname=$fileroot+ encode($count)+ ".axis")
evaluate ($fname=$fileroot+ encode($count)+ ".prt")
evaluate ($sname=$fileroot+ encode($count)+ ".sani")

print threshold=0.3 noe
evaluate ($rms_noe=$result)
evaluate ($violations_noe=$violations)
print threshold=5. cdih
evaluate ($rms_cdih=$result)
evaluate ($violations_cdih=$violations)
print thres=0.05 bonds
evaluate ($rms_bonds=$result)
print thres=0.5 angles
evaluate ($rms_angles=$result)
print thres=5. impropers
evaluate ($rms_impropers=$result)
remarks initial random number seed: $seed
remarks =====
remarks          overall,bonds,angles,improper,vdw,noe,cdih
remarks energies: $ener, $bond, $angl, $impr, $vdw, $noe, $cdih, $coup
remarks =====
remarks          bonds,angles,impropers,noe,cdih
remarks rms-dev.:  $rms_bonds,$rms_angles,$rms_impropers,$rms_noe,
$rms_cdih
remarks =====
remarks          noe,  cdih
remarks violations.: $violations_noe, $violations_cdih
remarks =====
write coordinates sele= (resid 500) output =$outname end
write coordinates sele= (not (resid 500)) output =$filename end

set print = $fname end
noe print thresh = 0.1 end
close $fname end

! set print = $sname end
! sani print thresh = 0.1 end
! close $sname end

end loop main

stop

```

11.2.3 nih3GRID_55_40_final.inp: Protokoll zur Verfeinerung der Strukturen mittels residualen dipolaren Kopplungen

```

remarks sa_1.inp
remarks Author: Michael Nilges

evaluate ($ini_count = 3)
evaluate ($end_count = 8)

evaluate ($iniseed = 100046)
evaluate ($iniseed2 = 554321) !changed HS
evaluate ($iniseed3 = 204875) !changed HS
evaluate ($iniseed4 = 395164) !changed HS

evaluate ($init_t = 1000 ) {* initial simulated annealing temperature *}
evaluate ($high_steps = 3000) !50000

```

```

evaluate ($cool_steps = 30000) !50000

evaluate ($fileroot = "../nih3_final_031202/progua_55_40_")
!evaluate ($reference = "il8_n.pdb")
!evaluate ($template = "../struktur/nih3_final/rnk_progua_011202_1.pdb")

structure @@../INPUT/progua.psf end
structure @../INPUT/axis_hs.psf end

parameter @@../INPUT/parallhdg.hs end
param @./para_axis_3.pro end

parameter nbfix S S 462 13.6 462 13.6 end
parameter
  bond (name sg) (name sg) 0.0 TOKEN
  angle (all) (name sg) (name sg) 0.0 TOKEN
end

!   coor @$template
!   coor @./axis.pdb
!
!   coor copy end

noe
  reset
  nrestraints = 5000                      ! allocate space for NOEs

  class      dist
    @../input/13c.longnoes
    @../input/13c.sequentialnoes
    @../input/13c_rdcs.mediumnoes
    @../input/15n.longnoes
    @../input/noes_051102.sequentialnoes
    @../input/15n.mediumnoes
    @../input/15n_neue_noes
    @../input/15n.intranoes
    @../input/2d_noes.xplorNOE
    @../input/hbonds_rdcs.h_bonds

  set echo on message on end

  ceiling=1000
  averaging * sum
  potential * square
  scale * 50.
  sqoffset * 0.0
  sqconstant * 1.0
  sqexponent * 2
  rswitch * 0.5

end

restraints dihedral
  nassign=1000
  @../input/jcouple_xplor
  @../input/2d_jcouple_xplor

end

noe
assign (resid 48 and name SG)(resid 61 and name SG) 2.02 0.1 0.1
assign (resid 83 and name SG)(resid 91 and name SG) 2.02 0.1 0.1
assign (resid 86 and name SG)(resid 94 and name SG) 2.02 0.1 0.1
end

evaluate ($ksani = 0.01)
sani
  nres=400
  class JNH
  force $ksani

```



```

    potential harmonic
    coeff 0.0 5.5 0.40
    @../INPUT/progua_resdicoup.xplor

end

sani class JNH force 0 end

parameter                      {*Parameters for the repulsive energy term.*}
    nbonds
        repel=0.75              {*Initial value for repel--modified later.*}
        rexp=2 irexp=2 rcon=1.
        nbxmod=3
        wmin=0.01
        cutnb=4.5 ctonnb=2.99 ctofnb=3.
        tolerance=0.5
    end
end

restraints dihedral
    scale=5.
end

set echo off message off end

evaluate ($ramacoff = -0.5*10.0**2)
evaluate ($krama = 1.0)

rama
    nres=10000
    cutoff=$ramacoff
    @/raid1/philipp/xplor-
    nih-1.2.1/databases/torsions_gaussians/shortrange_gaussians.tbl
    @/raid1/philipp/xplor-
    nih-1.2.1/databases/torsions_gaussians/new_shortrange_force.tbl

end

@/raid1/philipp/xplor-
nih-1.2.1/databases/torsions_gaussians/newshortrange_setup.tbl

flags exclude * include bonds angle impr vdw noe cdih coup sani harm rama
end

set echo on message on end

@setup_swap_orig.hs

vector ident (store2) (store1)
parameter
    improper (store2) (store2) (all) (all) 0.0 TOKEN TOKEN
    improper (all) (all) (store2) (store2) 0.0 TOKEN TOKEN
end

evaluate ($count = $ini_count)
while ($count < $end_count ) loop main

    evaluate ($count=$count+1)
    evaluate ($nreassign = 0)

    evaluate ($template = "../struktur/nih3_final/rnk_progua_011202_"+
    encode($count)+ ".pdb")

    coor @@$template
    coor @./axis.pdb

!    coor swap end
!    coor copy end

```

```

        evaluate ($seed =$count*$iniseed)
if ($count > 60) then
    evaluate ($seed =($count-60)*$iniseed2)
end if

if ($count > 120) then
    evaluate ($seed =($count-120)*$iniseed3)
end if

if ($count > 180) then
    evaluate ($seed =($count-180)*$iniseed4)
end if

        set seed $seed end

                                { *Friction coefficient for MD heatbath, in 1/ps.    *}
vector do (fbeta=10) (all)
                                { *Uniform heavy masses to speed molecular dynamics.*}

vector do (mass=100) (not (resid 500 or resid 600))
vector do (mass = 30.0) (resid 500 or resid 600)

! Fixing the axis using harmonic restraint
! leave out, let both rotate

vector do (refx=x) (all)
vector do (refy=y) (all)
vector do (refz=z) (all)

!vector do (harmonic=20.0) (resid 500 and name OO)
!vector do (harmonic=0.0) (resid 500 and name Z )
!vector do (harmonic=0.0) (resid 500 and name X )
!vector do (harmonic=0.0) (resid 500 and name Y )
!vector do (harmonic=0.0) (not (resid 500))
!restraints harmonic exponent=2 end
!flags include harm end

constraints fix ((resid 500 or resid 600) and name OO) end

!Original part from RNA-refinement protocol

vector do (vx=maxwell($init_t)) (all)
vector do (vy=maxwell($init_t)) (all)
vector do (vz=maxwell($init_t)) (all)

!swap adopted from Nilges Protocol

        evaluate ($swap = 1.001)
        flags exclude * include noe end
        @swap15v.xplor
        flags exclude * include bond angl impr vdw noe cdih coup sani harm rama
end

        restraints dihedral    scale=5.    end
        noe asymptote * 1.0    end

        constraints interaction
            (all) (all) weights * 1 end end

!    minimize powell nstep=500 drop=10.  nprint=25 end

{* ===== High-temperature dynamics.*}

        minimize powell nstep=500 drop=10.  nprint=25 end

        constraints interaction (all) (all)

```

```

        weights * 1 end end

eval ($init_kcdih=50)
eval ($end_kcdih=55)
eval ($cdihstep=1)
eval ($kcdih=49)

eval ($ncycle=($end_kcdih-$kcdih)/$cdihstep)
eval ($nstep= int($high_steps/$ncycle))

eval ($i_cdih=0)
while ($i_cdih < $ncycle) loop cdih1
eval ($i_cdih = $i_cdih+1)
eval ($kcdih = $kcdih+$cdihstep)
restraints dihedral scale=$kcdih end

    dynamics verlet
        nstep=$nstep      timestep=0.0005      iasvel=current      firstt=$init_t
        tcoupling=true     tbath=$init_t      nprint=50      iprfrq=0
    end

end loop cdih1

constraints interaction (all) (all) weights * 1 end end

    restraints dihedral      scale=50.      end

    evaluate ($final_t = 300)      { K }
    evaluate ($tempstep = 25)      { K }

    evaluate ($ncycle = ($init_t-$final_t)/$tempstep)
    evaluate ($nstep = int($cool_steps/$ncycle))

    evaluate ($ini_rad = 0.9)      evaluate ($fin_rad = 0.75)
    evaluate ($ini_con= 0.003)      evaluate ($fin_con= 4.0)

!inserted HS
evaluate ($ini_sani = 0.01)      evaluate ($fin_sani = 1.0)
evaluate ($sani_fac = ($fin_sani/$ini_sani)^(1/$ncycle))
evaluate ($ksani = $ini_sani)
sani class JNH force $ksani end

    evaluate ($bath = $init_t)
    evaluate ($k_vdw = $ini_con)
    evaluate ($k_vdwfact = ($fin_con/$ini_con)^(1/$ncycle))
    evaluate ($radius= $ini_rad)
    evaluate ($radfact = ($fin_rad/$ini_rad)^(1/$ncycle))

    evaluate ($i_cool = 0)
    while ($i_cool < $ncycle) loop cool
        evaluate ($i_cool=$i_cool+1)

        evaluate ($bath = $bath - $tempstep)
        evaluate ($k_vdw=min($fin_con,$k_vdw*$k_vdwfact))
        evaluate ($radius=max($fin_rad,$radius*$radfact))

!inserted HS
evaluate ($ksani = $ksani*$sani_fac)
sani class JNH force $ksani end

    parameter nbonds repel=$radius end end
    constraints interaction (not name SG) (all)
        weights * 1. vdw $k_vdw end end

    dynamics verlet
        nstep=$nstep time=0.0005 iasvel=current firstt=$bath
        tcoupling=true tbath=$bath nprint=$nstep iprfrq=0

```

```

        end
        evaluate ($critical=$temp/$bath)
        if ($critical > 10. ) then
            display ****&&&& rerun job with smaller timestep (i.e., 0.003)
            stop
        end if
    end loop cool

{* ===== Final minimization.*}

constraints interaction (all) (all) weights * 1. vdw 1. end end
parameter
    nbonds
        repel=0.75                !changed HS, original value 0.80
        rexp=2 irexp=2 rcon=1.
        nbxmod=3
        wmin=0.01
        cutnb=6.0 ctonnb=2.99 ctofnb=3.
        tolerance=1.5
    end
end

minimize powell nstep=1000 drop=10.0 nprint=25 end

flags exclude * include bond angl impr vdw noe cdih coup sani harm end

minimize powell nstep=200 drop=10.0 nprint=25 end

flags exclude * include bond angl impr vdw noe cdih coup sani harm rama
end

sani class JNH force 0 end

{* 6 ===== write out the final structure(s)
*}

evaluate ($filename=$fileroot+ encode($count)+ ".pdb")
evaluate ($outname=$fileroot+ encode($count)+ ".axis")
evaluate ($fname=$fileroot+ encode($count)+ ".prt")
evaluate ($sname=$fileroot+ encode($count)+ ".sani")

print threshold=0.3 noe
evaluate ($rms_noe=$result)
evaluate ($violations_noe=$violations)
print threshold=5. cdih
evaluate ($rms_cdih=$result)
evaluate ($violations_cdih=$violations)
print thres=0.05 bonds
evaluate ($rms_bonds=$result)
print thres=0.5 angles
evaluate ($rms_angles=$result)
print thres=5. impropers
evaluate ($rms_impropers=$result)
remarks initial random number seed: $seed
remarks =====
remarks          overall,bonds,angles,improper,vdw,noe,cdih
remarks energies: $ener, $bond, $angl, $impr, $vdw, $noe, $cdih, $coup
remarks =====
remarks          bonds,angles,impropers,noe,cdih
remarks    rms-dev.:  $rms_bonds,$rms_angles,$rms_impropers,$rms_noe,
$rms_cdih
remarks =====
remarks          noe, cdih
remarks violations.: $violations_noe, $violations_cdih
remarks =====
write coordinates sele= (resid 500) output =$outname end
write coordinates sele= (not (resid 500)) output =$filename end

```

```
    set print = $fname end
    noe print thresh = 0.1 end
    close $fname end

!   set print = $sname end
!   sani print thresh = 0.1 end
!   close $sname end

end loop main

stop
```

11.3 Chemische Verschiebungen für Proguanylin (BMRB 5603)

1	VAL	H	H	8,509
1	VAL	HA	H	4,548
1	VAL	HB	H	1,957
1	VAL	HG1	H	1,297
1	VAL	HG2	H	1,121
1	VAL	C	C	177,273
1	VAL	CA	C	63,022
1	VAL	CB	C	32,592
1	VAL	CG1	C	23,015
1	VAL	CG2	C	23,015
1	VAL	N	N	124,394
2	THR	H	H	9,266
2	THR	HA	H	4,808
2	THR	HB	H	3,833
2	THR	HG2	H	1,035
2	THR	C	C	172,030
2	THR	CA	C	60,827
2	THR	CB	C	71,365
2	THR	CG2	C	21,719
2	THR	N	N	123,428
3	VAL	H	H	9,710
3	VAL	HA	H	4,724
3	VAL	HB	H	2,112
3	VAL	HG1	H	1,052
3	VAL	HG2	H	0,896
3	VAL	C	C	174,804
3	VAL	CA	C	60,920
3	VAL	CB	C	33,575
3	VAL	CG1	C	21,832
3	VAL	CG2	C	21,832
3	VAL	N	N	125,384
4	GLN	H	H	9,172
4	GLN	HA	H	5,141
4	GLN	HB2	H	2,064
4	GLN	HB3	H	2,064
4	GLN	HG2	H	2,297
4	GLN	HG3	H	2,297
4	GLN	HE21	H	7,395
4	GLN	HE22	H	6,675
4	GLN	C	C	176,610
4	GLN	CA	C	54,226
4	GLN	CB	C	30,458
4	GLN	CG	C	34,395
4	GLN	N	N	126,838
4	GLN	NE2	N	111,902
5	ASP	H	H	8,541
5	ASP	HA	H	4,570
5	ASP	HB2	H	2,985
5	ASP	HB3	H	2,265
5	ASP	C	C	175,304
5	ASP	CA	C	54,890
5	ASP	CB	C	44,387
5	ASP	N	N	126,111
6	GLY	H	H	9,048
6	GLY	HA2	H	4,024
6	GLY	HA3	H	3,626
6	GLY	C	C	175,390
6	GLY	CA	C	47,224
6	GLY	N	N	116,216
7	ASN	H	H	8,982
7	ASN	HA	H	4,572
7	ASN	HB2	H	2,614
7	ASN	HB3	H	2,190
7	ASN	HD21	H	7,420
7	ASN	HD22	H	6,784
7	ASN	C	C	174,656
7	ASN	CA	C	53,441

7	ASN	CB	C	38,333
7	ASN	N	N	125,317
7	ASN	ND2	N	113,147
8	PHE	H	H	8,272
8	PHE	HA	H	4,451
8	PHE	HB2	H	2,821
8	PHE	HB3	H	2,063
8	PHE	HD1	H	7,394
8	PHE	HD2	H	7,394
8	PHE	HE1	H	7,117
8	PHE	HE2	H	7,117
8	PHE	C	C	174,961
8	PHE	CA	C	57,524
8	PHE	CB	C	41,793
8	PHE	N	N	119,734
9	SER	H	H	8,101
9	SER	HA	H	4,924
9	SER	HB2	H	3,537
9	SER	HB3	H	3,537
9	SER	C	C	173,205
9	SER	CA	C	56,873
9	SER	CB	C	64,531
9	SER	N	N	116,369
10	PHE	H	H	9,197
10	PHE	HA	H	5,281
10	PHE	HB2	H	2,961
10	PHE	HB3	H	2,473
10	PHE	HD1	H	7,064
10	PHE	HD2	H	7,064
10	PHE	HE1	H	7,117
10	PHE	HE2	H	7,117
10	PHE	HZ	H	6,542
10	PHE	C	C	175,439
10	PHE	CA	C	53,905
10	PHE	CB	C	43,711
10	PHE	N	N	123,859
11	SER	H	H	10,020
11	SER	HA	H	4,502
11	SER	HB2	H	4,377
11	SER	HB3	H	4,377
11	SER	C	C	175,479
11	SER	CA	C	59,129
11	SER	CB	C	63,333
11	SER	N	N	120,506
12	LEU	H	H	8,668
12	LEU	HA	H	4,085
12	LEU	HB2	H	1,274
12	LEU	HB3	H	1,274
12	LEU	HG	H	1,980
12	LEU	HD1	H	0,998
12	LEU	HD2	H	0,998
12	LEU	N	N	124,914
13	GLU	H	H	8,562
13	GLU	HA	H	3,878
13	GLU	HB2	H	2,060
13	GLU	HB3	H	2,060
13	GLU	HG2	H	2,353
13	GLU	HG3	H	2,353
13	GLU	C	C	178,979
13	GLU	CA	C	60,205
13	GLU	CB	C	29,371
13	GLU	CG	C	36,390
13	GLU	N	N	116,846
14	SER	H	H	7,784
14	SER	HA	H	4,128
14	SER	HB2	H	3,815
14	SER	HB3	H	3,507
14	SER	C	C	175,111
14	SER	CA	C	62,351
14	SER	CB	C	62,761
14	SER	N	N	114,887
15	VAL	H	H	7,590

15	VAL	HA	H	3,240	21	LEU	HA	H	4,327
15	VAL	HB	H	2,277	21	LEU	HB2	H	1,456
15	VAL	HG1	H	0,972	21	LEU	HB3	H	1,456
15	VAL	HG2	H	0,856	21	LEU	HG	H	1,765
15	VAL	C	C	177,943	21	LEU	HD1	H	0,898
15	VAL	CA	C	66,915	21	LEU	HD2	H	0,779
15	VAL	CB	C	32,061	21	LEU	N	N	118,180
15	VAL	CG1	C	24,205	22	GLN	H	H	7,757
15	VAL	CG2	C	22,430	22	GLN	HA	H	4,329
15	VAL	N	N	122,284	22	GLN	HB2	H	2,088
16	LYS	H	H	8,673	22	GLN	HB3	H	1,974
16	LYS	HA	H	3,718	22	GLN	HG2	H	2,392
16	LYS	HB2	H	1,879	22	GLN	HG3	H	2,392
16	LYS	HB3	H	1,879	22	GLN	HE21	H	7,508
16	LYS	HG2	H	1,376	22	GLN	HE22	H	6,934
16	LYS	HG3	H	1,376	22	GLN	C	C	175,570
16	LYS	HD2	H	1,644	22	GLN	CA	C	55,417
16	LYS	HD3	H	1,644	22	GLN	N	N	118,498
16	LYS	C	C	179,332	22	GLN	NE2	N	112,196
16	LYS	CA	C	60,679	23	GLU	H	H	8,599
16	LYS	CB	C	32,926	23	GLU	HA	H	4,542
16	LYS	CD	C	30,110	23	GLU	HB2	H	2,075
16	LYS	CE	C	41,706	23	GLU	HB3	H	1,911
16	LYS	N	N	115,671	23	GLU	HG2	H	2,323
17	LYS	H	H	7,189	23	GLU	HG3	H	2,323
17	LYS	HA	H	4,110	23	GLU	CA	C	54,571
17	LYS	HB2	H	1,963	23	GLU	N	N	124,005
17	LYS	HB3	H	1,963	24	PRO	HA	H	4,421
17	LYS	HG2	H	1,592	24	PRO	HB2	H	2,302
17	LYS	HG3	H	1,592	24	PRO	HB3	H	1,916
17	LYS	HD2	H	1,769	24	PRO	HG2	H	2,024
17	LYS	HD3	H	1,769	24	PRO	HG3	H	2,024
17	LYS	HE2	H	2,969	24	PRO	HD2	H	3,805
17	LYS	HE3	H	2,969	24	PRO	HD3	H	3,688
17	LYS	C	C	177,964	24	PRO	C	C	176,861
17	LYS	CA	C	57,944	24	PRO	CA	C	63,427
17	LYS	CB	C	32,006	24	PRO	CB	C	32,208
17	LYS	CG	C	25,487	24	PRO	CG	C	27,501
17	LYS	CD	C	29,204	24	PRO	CD	C	50,773
17	LYS	CE	C	42,673	25	GLN	H	H	8,564
17	LYS	N	N	117,198	25	GLN	HA	H	4,331
18	LEU	H	H	7,793	25	GLN	HB2	H	2,123
18	LEU	HA	H	3,816	25	GLN	HB3	H	1,966
18	LEU	HB2	H	1,722	25	GLN	HG2	H	2,368
18	LEU	HB3	H	1,294	25	GLN	HG3	H	2,368
18	LEU	HG	H	1,649	25	GLN	HE21	H	7,608
18	LEU	HD1	H	0,677	25	GLN	HE22	H	6,917
18	LEU	HD2	H	0,527	25	GLN	CA	C	55,567
18	LEU	N	N	115,732	25	GLN	N	N	120,130
19	LYS	H	H	7,244	25	GLN	NE2	N	113,071
19	LYS	HA	H	4,057	26	GLU	H	H	8,313
19	LYS	HB2	H	1,816	26	GLU	HA	H	4,581
19	LYS	HB3	H	1,693	26	GLU	HB2	H	2,031
19	LYS	HG2	H	1,590	26	GLU	HB3	H	1,932
19	LYS	HG3	H	1,590	26	GLU	HG2	H	2,297
19	LYS	HD2	H	1,794	26	GLU	HG3	H	2,297
19	LYS	HD3	H	1,794	26	GLU	N	N	122,968
19	LYS	C	C	177,494	27	PRO	HA	H	4,394
19	LYS	CA	C	58,959	27	PRO	HB2	H	2,294
19	LYS	CB	C	32,465	27	PRO	HB3	H	2,044
19	LYS	CD	C	29,090	27	PRO	C	C	176,941
19	LYS	CE	C	42,220	28	ARG	H	H	8,532
19	LYS	N	N	118,165	28	ARG	HA	H	4,336
20	ASP	H	H	7,688	28	ARG	HB2	H	1,817
20	ASP	HA	H	4,578	28	ARG	HB3	H	1,817
20	ASP	HB2	H	2,847	28	ARG	HG2	H	1,672
20	ASP	HB3	H	2,658	28	ARG	HG3	H	1,672
20	ASP	C	C	176,442	28	ARG	HD2	H	3,202
20	ASP	CA	C	55,488	28	ARG	HD3	H	3,202
20	ASP	CB	C	40,497	28	ARG	HE	H	7,350
20	ASP	N	N	116,773	28	ARG	C	C	176,398
21	LEU	H	H	7,245	28	ARG	CA	C	56,328

28	ARG	N	N	121,047	35	PHE	CA	C	57,525
28	ARG	NE	N	84,736	35	PHE	CB	C	39,940
29	VAL	H	H	8,096	35	PHE	N	N	120,642
29	VAL	HA	H	4,130	36	ALA	H	H	8,159
29	VAL	HB	H	2,096	36	ALA	HA	H	4,606
29	VAL	HG1	H	0,949	36	ALA	HB	H	1,323
29	VAL	HG2	H	0,949	36	ALA	CA	C	50,069
29	VAL	C	C	176,576	36	ALA	N	N	126,965
29	VAL	CA	C	62,466	37	PRO	HA	H	4,388
29	VAL	CB	C	32,873	37	PRO	HB2	H	2,244
29	VAL	CG1	C	20,749	37	PRO	HB3	H	1,857
29	VAL	CG2	C	20,749	37	PRO	HD2	H	3,661
29	VAL	N	N	120,112	37	PRO	HD3	H	3,635
30	GLY	H	H	8,508	37	PRO	C	C	176,664
30	GLY	HA2	H	3,949	37	PRO	CA	C	62,693
30	GLY	HA3	H	3,949	37	PRO	CB	C	31,961
30	GLY	C	C	173,990	38	ILE	H	H	8,415
30	GLY	CA	C	45,050	38	ILE	HA	H	4,419
30	GLY	N	N	112,276	38	ILE	HB	H	1,860
31	LYS	H	H	8,218	38	ILE	HG12	H	1,560
31	LYS	HA	H	4,313	38	ILE	HG13	H	1,207
31	LYS	HB2	H	1,763	38	ILE	HG2	H	0,950
31	LYS	HB3	H	1,763	38	ILE	HD1	H	0,872
31	LYS	HG2	H	1,403	38	ILE	CA	C	58,668
31	LYS	HG3	H	1,403	38	ILE	N	N	123,402
31	LYS	HD2	H	1,763	39	PRO	HA	H	4,357
31	LYS	HD3	H	1,763	39	PRO	HB2	H	2,311
31	LYS	C	C	176,679	39	PRO	HB3	H	1,953
31	LYS	CA	C	56,409	39	PRO	C	C	177,527
31	LYS	N	N	120,803	40	GLY	H	H	8,657
32	LEU	H	H	8,285	40	GLY	HA2	H	4,157
32	LEU	HA	H	4,311	40	GLY	HA3	H	3,792
32	LEU	HB2	H	1,667	40	GLY	C	C	174,167
32	LEU	HB3	H	1,667	40	GLY	CA	C	45,050
32	LEU	HG	H	1,613	40	GLY	N	N	110,999
32	LEU	HD1	H	0,930	41	GLU	H	H	7,905
32	LEU	HD2	H	0,861	41	GLU	HA	H	4,674
32	LEU	N	N	122,732	41	GLU	HB2	H	2,068
33	ARG	H	H	8,311	41	GLU	HB3	H	1,958
33	ARG	HA	H	4,246	41	GLU	HG2	H	2,275
33	ARG	HB2	H	1,711	41	GLU	HG3	H	2,275
33	ARG	HB3	H	1,711	41	GLU	CA	C	54,193
33	ARG	HG2	H	1,586	41	GLU	N	N	121,358
33	ARG	HG3	H	1,586	42	PRO	HA	H	4,473
33	ARG	HD2	H	3,165	42	PRO	HB2	H	2,302
33	ARG	HD3	H	3,165	42	PRO	HB3	H	1,924
33	ARG	HE	H	7,299	42	PRO	HG2	H	2,025
33	ARG	CA	C	56,125	42	PRO	HG3	H	2,025
33	ARG	CD	C	43,261	42	PRO	HD2	H	3,675
33	ARG	CZ	C	159,575	42	PRO	HD3	H	3,675
33	ARG	N	N	121,418	42	PRO	C	C	176,599
33	ARG	NE	N	84,610	42	PRO	CA	C	62,908
34	ASN	H	H	8,361	42	PRO	CB	C	31,975
34	ASN	HA	H	4,664	42	PRO	CG	C	27,559
34	ASN	HB2	H	2,693	42	PRO	CD	C	50,555
34	ASN	HB3	H	2,693	43	VAL	H	H	8,366
34	ASN	HD21	H	7,601	43	VAL	HA	H	4,108
34	ASN	HD22	H	6,906	43	VAL	HB	H	2,049
34	ASN	C	C	174,526	43	VAL	HG1	H	0,981
34	ASN	CA	C	53,056	43	VAL	HG2	H	0,981
34	ASN	CB	C	38,810	43	VAL	C	C	176,260
34	ASN	N	N	119,472	43	VAL	CA	C	62,542
34	ASN	ND2	N	112,671	43	VAL	CB	C	32,671
35	PHE	H	H	8,217	43	VAL	CG1	C	21,050
35	PHE	HA	H	4,604	43	VAL	CG2	C	21,050
35	PHE	HB2	H	3,143	43	VAL	N	N	121,500
35	PHE	HB3	H	2,994	44	VAL	H	H	8,198
35	PHE	HD1	H	7,242	44	VAL	HA	H	4,352
35	PHE	HD2	H	7,242	44	VAL	HB	H	1,961
35	PHE	HE1	H	6,888	44	VAL	HG1	H	0,941
35	PHE	HE2	H	6,888	44	VAL	HG2	H	0,941
35	PHE	C	C	174,649	44	VAL	CA	C	60,320

44	VAL	N	N	125,948	53	PHE	H	H	8,044
45	PRO	HA	H	4,406	53	PHE	HA	H	4,214
45	PRO	HB2	H	2,281	53	PHE	HB2	H	3,431
45	PRO	HB3	H	1,887	53	PHE	HB3	H	2,926
45	PRO	C	C	176,861	53	PHE	HD1	H	6,898
45	PRO	CA	C	63,123	53	PHE	HD2	H	6,898
45	PRO	CB	C	31,999	53	PHE	HE1	H	6,835
46	ILE	H	H	8,568	53	PHE	HE2	H	6,835
46	ILE	HA	H	4,055	53	PHE	HZ	H	6,783
46	ILE	HB	H	1,867	53	PHE	CA	C	57,611
46	ILE	HG12	H	1,605	53	PHE	N	N	124,422
46	ILE	HG13	H	1,498	54	PRO	HA	H	4,169
46	ILE	HG2	H	0,957	54	PRO	HB2	H	2,203
46	ILE	HD1	H	0,957	54	PRO	HB3	H	1,441
46	ILE	CA	C	56,052	54	PRO	HG2	H	1,634
46	ILE	N	N	121,768	54	PRO	HG3	H	1,634
47	LEU	H	H		54	PRO	C	C	177,450
47	LEU	HA	H		54	PRO	CA	C	63,051
47	LEU	HB2	H		54	PRO	CB	C	31,774
47	LEU	HB3	H		54	PRO	CG	C	27,760
47	LEU	HG	H		55	GLU	H	H	8,762
47	LEU	HD1	H		55	GLU	HA	H	3,864
47	LEU	HD2	H		55	GLU	HB2	H	2,195
47	LEU	N	N		55	GLU	HB3	H	2,035
48	CYS	H	H	7,106	55	GLU	HG2	H	2,386
48	CYS	HA	H	3,419	55	GLU	HG3	H	2,386
48	CYS	HB2	H	2,828	55	GLU	C	C	179,533
48	CYS	HB3	H	2,593	55	GLU	CA	C	59,668
48	CYS	C	C	174,580	55	GLU	CB	C	29,787
48	CYS	CA	C	61,030	55	GLU	CG	C	35,596
48	CYS	CB	C	46,152	55	GLU	N	N	126,482
48	CYS	N	N	110,836	56	GLU	H	H	9,075
49	SER	H	H	7,552	56	GLU	HA	H	4,047
49	SER	HA	H	4,416	56	GLU	HB2	H	2,228
49	SER	HB2	H	3,924	56	GLU	HB3	H	1,683
49	SER	HB3	H	3,924	56	GLU	HG2	H	2,675
49	SER	C	C	173,918	56	GLU	HG3	H	2,675
49	SER	CA	C	58,325	56	GLU	C	C	176,523
49	SER	CB	C	63,830	56	GLU	CA	C	58,640
49	SER	N	N	112,382	56	GLU	CB	C	29,921
50	ASN	H	H	7,757	56	GLU	CG	C	36,256
50	ASN	HA	H	4,808	56	GLU	N	N	117,598
50	ASN	HB2	H	2,987	57	LEU	H	H	7,124
50	ASN	HB3	H	2,987	57	LEU	HA	H	3,887
50	ASN	HD21	H	8,154	57	LEU	HB2	H	1,199
50	ASN	HD22	H	7,391	57	LEU	HB3	H	1,199
50	ASN	CA	C	52,187	57	LEU	HG	H	0,780
50	ASN	N	N	125,553	57	LEU	HD1	H	0,213
50	ASN	ND2	N	116,193	57	LEU	HD2	H	-0,072
51	PRO	HA	H	4,428	57	LEU	N	N	111,280
51	PRO	HB2	H	2,422	58	LYS	H	H	7,451
51	PRO	HB3	H	1,946	58	LYS	HA	H	4,205
51	PRO	HG2	H	2,019	58	LYS	HB2	H	2,135
51	PRO	HG3	H	2,019	58	LYS	HB3	H	2,135
51	PRO	HD2	H	3,968	58	LYS	HG2	H	1,620
51	PRO	HD3	H	3,732	58	LYS	HG3	H	1,620
51	PRO	C	C	176,888	58	LYS	HD2	H	1,950
51	PRO	CA	C	64,650	58	LYS	HD3	H	1,950
51	PRO	CB	C	32,048	58	LYS	CA	C	61,641
51	PRO	CG	C	27,343	58	LYS	N	N	119,227
51	PRO	CD	C	51,326	59	PRO	HA	H	4,372
52	ASN	H	H	8,993	59	PRO	HB2	H	2,650
52	ASN	HA	H	4,929	59	PRO	HB3	H	1,692
52	ASN	HB2	H	2,967	59	PRO	HG2	H	2,313
52	ASN	HB3	H	2,509	59	PRO	HG3	H	2,313
52	ASN	HD21	H	7,698	59	PRO	HD2	H	3,841
52	ASN	HD22	H	7,068	59	PRO	HD3	H	3,588
52	ASN	C	C	174,315	59	PRO	C	C	178,694
52	ASN	CA	C	52,349	59	PRO	CA	C	66,498
52	ASN	CB	C	39,040	59	PRO	CB	C	32,237
52	ASN	N	N	114,817	59	PRO	CG	C	28,502
52	ASN	ND2	N	114,344	60	LEU	H	H	8,013

60	LEU	HA	H	3,935	67	GLN	HB2	H	2,095
60	LEU	HB2	H	1,733	67	GLN	HB3	H	2,095
60	LEU	HB3	H	1,338	67	GLN	HG2	H	2,415
60	LEU	HG	H	2,195	67	GLN	HG3	H	2,415
60	LEU	HD1	H	0,692	67	GLN	HE21	H	7,561
60	LEU	HD2	H	0,692	67	GLN	HE22	H	6,947
60	LEU	N	N	115,204	67	GLN	C	C	177,978
61	CYS	H	H	7,959	67	GLN	CA	C	59,266
61	CYS	HA	H	3,942	67	GLN	CB	C	28,149
61	CYS	HB2	H	3,332	67	GLN	CG	C	33,393
61	CYS	HB3	H	2,909	67	GLN	N	N	114,135
61	CYS	C	C	174,220	67	GLN	NE2	N	111,965
61	CYS	CA	C	59,627	68	GLU	H	H	7,709
61	CYS	CB	C	43,817	68	GLU	HA	H	4,078
61	CYS	N	N	115,889	68	GLU	HB2	H	2,220
62	LYS	H	H	7,171	68	GLU	HB3	H	2,220
62	LYS	HA	H	4,479	68	GLU	HG2	H	2,398
62	LYS	HB2	H	1,957	68	GLU	HG3	H	2,398
62	LYS	HB3	H	1,957	68	GLU	C	C	179,037
62	LYS	HG2	H	1,494	68	GLU	CA	C	59,331
62	LYS	HG3	H	1,494	68	GLU	CB	C	29,524
62	LYS	HD2	H	1,733	68	GLU	CG	C	36,714
62	LYS	HD3	H	1,733	68	GLU	N	N	119,284
62	LYS	HE2	H	3,065	69	ILE	H	H	7,864
62	LYS	HE3	H	3,065	69	ILE	HA	H	3,678
62	LYS	C	C	176,885	69	ILE	HB	H	1,767
62	LYS	CA	C	55,618	69	ILE	HG12	H	1,146
62	LYS	CB	C	32,746	69	ILE	HG13	H	1,146
62	LYS	CG	C	24,437	69	ILE	HG2	H	0,922
62	LYS	CD	C	29,112	69	ILE	HD1	H	0,959
62	LYS	CE	C	42,159	69	ILE	C	C	178,449
62	LYS	N	N	114,949	69	ILE	CA	C	65,245
63	GLU	H	H	7,687	69	ILE	CB	C	38,828
63	GLU	HA	H	4,521	69	ILE	CG2	C	17,631
63	GLU	HB2	H	2,116	69	ILE	N	N	119,459
63	GLU	HB3	H	2,116	70	LEU	H	H	8,544
63	GLU	HG2	H	2,550	70	LEU	HA	H	3,868
63	GLU	HG3	H	2,435	70	LEU	HB2	H	1,740
63	GLU	CA	C	54,247	70	LEU	HB3	H	1,740
63	GLU	N	N	120,205	70	LEU	HG	H	1,740
64	PRO	HA	H	4,443	70	LEU	HD1	H	0,960
64	PRO	HB2	H	2,424	70	LEU	HD2	H	0,960
64	PRO	HB3	H	2,080	70	LEU	N	N	117,657
64	PRO	HG2	H	2,139	71	GLN	H	H	8,075
64	PRO	HG3	H	2,139	71	GLN	HA	H	4,048
64	PRO	HD2	H	4,022	71	GLN	HB2	H	2,229
64	PRO	HD3	H	3,907	71	GLN	HB3	H	2,229
64	PRO	C	C	176,930	71	GLN	HG2	H	2,493
64	PRO	CA	C	64,618	71	GLN	HG3	H	2,418
64	PRO	CB	C	31,493	71	GLN	HE21	H	7,649
64	PRO	CG	C	27,732	71	GLN	HE22	H	6,898
64	PRO	CD	C	50,349	71	GLN	C	C	178,883
65	ASN	H	H	8,356	71	GLN	CA	C	59,301
65	ASN	HA	H	5,183	71	GLN	CB	C	28,140
65	ASN	HB2	H	3,185	71	GLN	CG	C	34,104
65	ASN	HB3	H	2,801	71	GLN	N	N	117,524
65	ASN	HD21	H	7,854	71	GLN	NE2	N	112,190
65	ASN	HD22	H	6,906	72	ARG	H	H	7,536
65	ASN	C	C	175,225	72	ARG	HA	H	4,128
65	ASN	CA	C	52,014	72	ARG	HB2	H	2,392
65	ASN	CB	C	36,493	72	ARG	HB3	H	2,392
65	ASN	N	N	114,136	72	ARG	HG2	H	1,709
65	ASN	ND2	N	111,681	72	ARG	HG3	H	1,709
66	ALA	H	H	7,423	72	ARG	HD2	H	3,516
66	ALA	HA	H	3,875	72	ARG	HD3	H	3,120
66	ALA	HB	H	1,614	72	ARG	HE	H	9,996
66	ALA	C	C	178,550	72	ARG	HH11	H	6,770
66	ALA	CA	C	56,247	72	ARG	HH12	H	6,770
66	ALA	CB	C	21,045	72	ARG	HH21	H	6,770
66	ALA	N	N	122,272	72	ARG	HH22	H	6,770
67	GLN	H	H	8,934	72	ARG	C	C	180,439
67	GLN	HA	H	3,907	72	ARG	CA	C	60,739

72	ARG	CB	C	31,247	79	ASP	N	N	114,328
72	ARG	CD	C	43,682	80	PRO	HA	H	4,652
72	ARG	CZ	C	159,895	80	PRO	HB2	H	2,067
72	ARG	N	N	118,571	80	PRO	HB3	H	1,966
72	ARG	NE	N	86,379	80	PRO	HD2	H	3,810
73	LEU	H	H	8,377	80	PRO	HD3	H	3,602
73	LEU	HA	H	4,038	80	PRO	C	C	177,950
73	LEU	HB2	H	1,848	80	PRO	CA	C	64,653
73	LEU	HB3	H	1,279	80	PRO	CB	C	32,143
73	LEU	HG	H	2,173	80	PRO	CG	C	26,405
73	LEU	HD1	H	0,924	80	PRO	CD	C	49,939
73	LEU	HD2	H	0,601	81	GLY	H	H	8,567
73	LEU	N	N	118,661	81	GLY	HA2	H	4,002
74	GLU	H	H	9,059	81	GLY	HA3	H	3,835
74	GLU	HA	H	3,727	81	GLY	C	C	176,586
74	GLU	HB2	H	2,211	81	GLY	CA	C	48,279
74	GLU	HB3	H	2,015	81	GLY	N	N	110,855
74	GLU	HG2	H	2,543	82	THR	H	H	8,395
74	GLU	HG3	H	2,543	82	THR	HA	H	4,058
74	GLU	C	C	178,513	82	THR	HB	H	4,194
74	GLU	CA	C	59,177	82	THR	HG2	H	1,203
74	GLU	CB	C	28,059	82	THR	C	C	176,442
74	GLU	CG	C	34,467	82	THR	CA	C	64,654
74	GLU	N	N	119,373	82	THR	CB	C	68,310
75	GLU	H	H	7,604	82	THR	CG2	C	22,860
75	GLU	HA	H	3,987	82	THR	N	N	112,757
75	GLU	HB2	H	2,145	83	CYS	H	H	8,245
75	GLU	HB3	H	2,145	83	CYS	HA	H	4,466
75	GLU	HG2	H	2,576	83	CYS	HB2	H	3,237
75	GLU	HG3	H	2,273	83	CYS	HB3	H	3,138
75	GLU	C	C	179,648	83	CYS	C	C	176,488
75	GLU	CA	C	59,299	83	CYS	CA	C	59,005
75	GLU	CB	C	28,890	83	CYS	CB	C	41,569
75	GLU	CG	C	35,897	83	CYS	N	N	124,125
75	GLU	N	N	118,304	84	GLU	H	H	8,648
76	ILE	H	H	7,020	84	GLU	HA	H	3,857
76	ILE	HA	H	3,500	84	GLU	HB2	H	2,262
76	ILE	HB	H	1,834	84	GLU	HB3	H	2,054
76	ILE	HG12	H	1,467	84	GLU	HG2	H	2,364
76	ILE	HG13	H	1,467	84	GLU	HG3	H	2,364
76	ILE	HG2	H	0,782	84	GLU	C	C	176,150
76	ILE	HD1	H	0,911	84	GLU	CA	C	59,198
76	ILE	C	C	176,847	84	GLU	CB	C	29,988
76	ILE	CA	C	64,585	84	GLU	CG	C	36,815
76	ILE	CB	C	38,061	84	GLU	N	N	117,360
76	ILE	CG1	C	28,395	85	ILE	H	H	6,675
76	ILE	CG2	C	17,315	85	ILE	HA	H	4,627
76	ILE	CD1	C	14,672	85	ILE	HB	H	2,289
76	ILE	N	N	120,136	85	ILE	HG12	H	1,496
77	ALA	H	H	8,127	85	ILE	HG13	H	1,300
77	ALA	HA	H	3,676	85	ILE	HG2	H	0,932
77	ALA	HB	H	1,465	85	ILE	HD1	H	0,932
77	ALA	C	C	178,911	85	ILE	C	C	177,156
77	ALA	CA	C	54,860	85	ILE	CA	C	60,763
77	ALA	CB	C	19,429	85	ILE	CB	C	37,649
77	ALA	N	N	119,084	85	ILE	CG2	C	17,637
78	GLU	H	H	7,711	85	ILE	CD1	C	14,050
78	GLU	HA	H	3,987	85	ILE	N	N	104,649
78	GLU	HB2	H	2,057	86	CYS	H	H	8,589
78	GLU	HB3	H	2,057	86	CYS	HA	H	4,023
78	GLU	HG2	H	2,409	86	CYS	HB2	H	3,606
78	GLU	HG3	H	2,409	86	CYS	HB3	H	3,473
78	GLU	C	C	176,916	86	CYS	C	C	173,833
78	GLU	CA	C	57,657	86	CYS	CA	C	60,383
78	GLU	CB	C	29,383	86	CYS	CB	C	36,923
78	GLU	CG	C	34,944	86	CYS	N	N	116,258
78	GLU	N	N	113,399	87	ALA	H	H	8,378
79	ASP	H	H	7,126	87	ALA	HA	H	4,561
79	ASP	HA	H	4,985	87	ALA	HB	H	1,478
79	ASP	HB2	H	2,876	87	ALA	C	C	176,837
79	ASP	HB3	H	2,560	87	ALA	CA	C	52,339
79	ASP	CA	C	52,035	87	ALA	CB	C	18,982

87	ALA	N	N	118,589
88	TYR	H	H	7,050
88	TYR	HA	H	4,804
88	TYR	HB2	H	2,973
88	TYR	HB3	H	2,973
88	TYR	HD1	H	7,233
88	TYR	HD2	H	7,233
88	TYR	HE1	H	6,938
88	TYR	HE2	H	6,938
88	TYR	C	C	176,997
88	TYR	CA	C	55,974
88	TYR	CB	C	39,866
88	TYR	N	N	118,345
89	ALA	H	H	8,421
89	ALA	HA	H	4,004
89	ALA	HB	H	1,317
89	ALA	C	C	177,700
89	ALA	CA	C	55,261
89	ALA	CB	C	18,434
89	ALA	N	N	127,101
90	ALA	H	H	6,462
90	ALA	HA	H	4,250
90	ALA	HB	H	1,616
90	ALA	C	C	176,357
90	ALA	CA	C	53,576
90	ALA	CB	C	19,766
90	ALA	N	N	115,217
91	CYS	H	H	8,052
91	CYS	HA	H	5,730
91	CYS	HB2	H	4,052
91	CYS	HB3	H	3,227
91	CYS	C	C	172,971
91	CYS	CA	C	57,323
91	CYS	CB	C	49,265
91	CYS	N	N	116,468
92	THR	H	H	9,019
92	THR	HA	H	4,885
92	THR	HB	H	4,270
92	THR	HG2	H	1,097
92	THR	C	C	173,286
92	THR	CA	C	60,221
92	THR	CB	C	72,181
92	THR	CG2	C	21,010
92	THR	N	N	113,933
93	GLY	H	H	8,642
93	GLY	HA2	H	4,821
93	GLY	HA3	H	3,616
93	GLY	C	C	174,629
93	GLY	CA	C	44,657
93	GLY	N	N	106,414
94	CYS	H	H	7,981
94	CYS	HA	H	4,155
94	CYS	HB2	H	3,178
94	CYS	HB3	H	3,017
94	CYS	CA	C	64,632
94	CYS	N	N	121,302

11.4 Chemische Verschiebungen für Proguanylin-C86S/C94S

1	VAL	HN	1N			
1	VAL	HA	1C			
1	VAL	HB	1C			
1	VAL	HG1*	3C			
1	VAL	HG2*	3C			
2	THR	HN	1N			
2	THR	HA	1C			
2	THR	HB	1C			
2	THR	HG*	3C			
3	VAL	HN	1N	8,567	122,023	
3	VAL	HA	1C	4,324		
3	VAL	HB	1C	2,037		
3	VAL	HG1*	3C	1,032		
3	VAL	HG2*	3C	1,032		
4	GLN	HN	1N	8,584	124,695	
4	GLN	HA	1C	4,926		
4	GLN	HB*	2C	2,004		
4	GLN	HG*	2C	2,293		
4	GLN	HE21	2N			
4	GLN	HE22	2N			
5	ASP	HN	1N	8,509	122,992	
5	ASP	HA	1C	4,686		
5	ASP	HB1	1C	2,851		
5	ASP	HB2	1C	2,471		
6	GLY	HN	1N			
6	GLY	HA1	1C			
6	GLY	HA2	1C			
7	ASN	HN	1N	8,797	123,646	
7	ASN	HA	1C	4,548		
7	ASN	HB1	1C	2,620		
7	ASN	HB2	1C	2,293		
7	ASN	HD21	2N			
7	ASN	HD22	2N			
8	PHE	HN	1N	8,082	119,410	
8	PHE	HA	1C	4,499		
8	PHE	HB1	1C	2,797		
8	PHE	HB2	1C	2,294		
8	PHE	HD*	2C			
8	PHE	HE*	2C			
8	PHE	HZ	1C			
9	SER	HN	1N	8,099	116,652	
9	SER	HA	1C	4,897		
9	SER	HB*	2C	3,538		
10	PHE	HN	1N	8,837	122,748	
10	PHE	HA	1C	5,186		
10	PHE	HB1	1C	2,986		
10	PHE	HB2	1C	2,456		
10	PHE	HD*	2C			
10	PHE	HE*	2C			
10	PHE	HZ	1C			
11	SER	HN	1N	9,795	119,212	
11	SER	HA	1C	4,527		
11	SER	HB*	2C	4,281		
12	LEU	HN	1N	8,689	125,258	
12	LEU	HA	1C	4,019		
12	LEU	HB1	1C	2,027		
12	LEU	HB2	1C	1,817		
12	LEU	HG	1C	1,384		
12	LEU	HD1*	3C	0,933		
12	LEU	HD2*	3C	0,933		
13	GLU	HN	1N	8,612	116,938	
13	GLU	HA	1C	3,899		
13	GLU	HB*	2C	2,052		
13	GLU	HG*	2C	2,354		
14	SER	HN	1N	7,760	115,349	
14	SER	HA	1C	4,062		
14	SER	HB1	1C	3,797		
14	SER	HB2	1C			
15	VAL	HN	1N			121,693
15	VAL	HA	1C			
15	VAL	HB	1C			
15	VAL	HG1*	3C			
15	VAL	HG2*	3C			
16	LYS	HN	1N			117,214
16	LYS	HA	1C			
16	LYS	HB*	2C			
16	LYS	HG*	2C			
16	LYS	HD*	2C			
16	LYS	HE*	2C	-100,000		
17	LYS	HN	1N			117,927
17	LYS	HA	1C			
17	LYS	HB*	2C			
17	LYS	HG*	2C			
17	LYS	HD*	2C			
17	LYS	HE*	2C			
18	LEU	HN	1N			116,425
18	LEU	HA	1C			
18	LEU	HB*	2C			
18	LEU	HG	1C			
18	LEU	HD1*	3C			
18	LEU	HD2*	3C			
19	LYS	HN	1N			118,260
19	LYS	HA	1C			
19	LYS	HB*	1C			
19	LYS	HG*	2C			
19	LYS	HD*	2C			
19	LYS	HE*	2C	-100,000		
20	ASP	HN	1N			116,573
20	ASP	HA	1C			
20	ASP	HB1	1C			
20	ASP	HB2	1C			
21	LEU	HN	1N			118,878
21	LEU	HA	1C			
21	LEU	HB*	2C			
21	LEU	HG	1C			
21	LEU	HD1*	3C			
21	LEU	HD2*	3C			
22	GLN	HN	1N			119,139
22	GLN	HA	1C			
22	GLN	HB*	2C			
22	GLN	HG*	2C			
22	GLN	HE21	2N			
22	GLN	HE22	2N			
23	GLU	HN	1N			123,272
23	GLU	HA	1C			
23	GLU	HB1	1C			
23	GLU	HB2	1C			
23	GLU	HG*	2C			
24	PRO	HA	1C			
24	PRO	HB1	1C			
24	PRO	HB2	1C			
24	PRO	HG*	2C			
24	PRO	HD1	1C			
24	PRO	HD2	1C			
25	GLN	HN	1N			120,228
25	GLN	HA	1C	8,519		
25	GLN	HB1	1C	4306,000		
25	GLN	HB2	1C	2,060		
25	GLN	HG*	2C	1,950		
25	GLN	HE21	2N	2,357		
25	GLN	HE22	2N			
26	GLU	HN	1N			122,993
26	GLU	HA	1C			
26	GLU	HB1	1C			
26	GLU	HB2	1C			
26	GLU	HG*	2C			
27	PRO	HA	1C			
27	PRO	HB1	1C			
27	PRO	HB2	1C			

27	PRO	HG*	2C				41	GLU	HB1	1C	2,066	
27	PRO	HD1	1C				41	GLU	HB2	1C	1,954	
27	PRO	HD2	1C				41	GLU	HG*	2C	2,370	
28	ARG	HN	1N	8,501	121,251		42	PRO	HA	1C		
28	ARG	HA	1C	4,343			42	PRO	HB1	1C		
28	ARG	HB*	2C	1,654			42	PRO	HB2	1C		
28	ARG	HG*	2C	1,798			42	PRO	HG*	2C		
28	ARG	HD*	2C	3,190			42	PRO	HD*	2C		
29	VAL	HN	1N	8,088	120,312		43	VAL	HN	1N	8,338	121,334
29	VAL	HA	1C	4,140			43	VAL	HA	1C	4,054	
29	VAL	HB	1C	2,076			43	VAL	HB	1C	2,036	
29	VAL	HG1*	3C	0,924			43	VAL	HG1*	3C	0,980	
29	VAL	HG2*	3C	0,924			43	VAL	HG2*	3C	0,980	
30	GLY	HN	1N	8,503	112,486		44	VAL	HN	1N	8,164	125,083
30	GLY	HA*	2C	3,942			44	VAL	HA	1C	4,299	
31	LYS	HN	1N	8,240	120,972		44	VAL	HB	1C	1,980	
31	LYS	HA	1C	4,288			44	VAL	HG1*	3C	0,933	
31	LYS	HB*	2C	1,746			44	VAL	HG2*	3C	0,933	
31	LYS	HG*	2C	1,408			45	PRO	HA	1C	4,571	
31	LYS	HD*	2C	1,746			45	PRO	HB1	1C		
31	LYS	HE*	2C				45	PRO	HB2	1C		
32	LEU	HN	1N	8,256	122,622		45	PRO	HG1	1C		
32	LEU	HA	1C	4,334			45	PRO	HG2	1C		
32	LEU	HB*	2C	1,630			45	PRO	HD1	1C		
32	LEU	HG	1C	1,630			45	PRO	HD2	1C		
32	LEU	HD1*	3C	0,891			46	ILE	HN	1N	8,577	121,860
32	LEU	HD2*	3C	0,891			46	ILE	HA	1C	4,324	
33	ARG	HN	1N	8,290	121,446		46	ILE	HB	1C	2,037	
33	ARG	HA	1C	4,225			46	ILE	HG11	1C	1,816	
33	ARG	HB*	2C	1,698			46	ILE	HG12	1C	1,653	
33	ARG	HG*	2C	1,565			46	ILE	HG2*	3C	1,032	
33	ARG	HD*	2C	3,162			46	ILE	HD1*	3C	1,032	
34	ASN	HN	1N	8,330	119,416		47	LEU	HN	1N		
34	ASN	HA	1C	4,631			47	LEU	HA	1C		
34	ASN	HB*	2C	2,689			47	LEU	HB*	2C		
34	ASN	HD21	2N				47	LEU	HG	1C		
34	ASN	HD22	2N				47	LEU	HD1*	3C		
35	PHE	HN	1N	8,214	120,619		47	LEU	HD2*	3C		
35	PHE	HA	1C	4,579			48	CYS	HN	1N		
35	PHE	HB1	1C	3,121			48	CYS	HA	1C		
35	PHE	HB2	1C	2,979			48	CYS	HB1	1C		
35	PHE	HD*	2C				48	CYS	HB2	1C		
35	PHE	HE*	2C				49	SER	HN	1N	7,505	112,236
35	PHE	HZ	1C				49	SER	HA	1C	4,394	
36	ALA	HN	1N	8,110	127,056		49	SER	HB*	2C	3,916	
36	ALA	HA	1C	4,578			50	ASN	HN	1N	7,738	125,605
36	ALA	HB*	3C	1,307			50	ASN	HA	1C	4,798	
37	PRO	HA	1C				50	ASN	HB*	2C	2,977	
37	PRO	HB1	1C				50	ASN	HD21	2N		
37	PRO	HB2	1C				50	ASN	HD22	2N		
37	PRO	HG1	1C				51	PRO	HA	1C		
37	PRO	HG2	1C				51	PRO	HB1	1C		
37	PRO	HD1	1C				51	PRO	HB2	1C		
37	PRO	HD2	1C				51	PRO	HG*	2C		
38	ILE	HN	1N	8,288	123,145		51	PRO	HD1	1C		
38	ILE	HA	1C	4,393			51	PRO	HD2	1C		
38	ILE	HB	1C	1,827			52	ASN	HN	1N	8,969	114,849
38	ILE	HG*	2C	1,186			52	ASN	HA	1C	4,880	
38	ILE	HG2*	3C	0,923			52	ASN	HB1	1C	2,946	
38	ILE	HD1*	3C	0,923			52	ASN	HB2	1C	2,495	
39	PRO	HA	1C	4,348			52	ASN	HD21	2N		
39	PRO	HB1	1C				52	ASN	HD22	2N		
39	PRO	HB2	1C				53	PHE	HN	1N	8,034	124,516
39	PRO	HG1	1C				53	PHE	HA	1C	4,216	
39	PRO	HG2	1C				53	PHE	HB1	1C	3,410	
39	PRO	HD1	1C				53	PHE	HB2	1C	2,924	
39	PRO	HD2	1C				53	PHE	HD*	2C		
40	GLY	HN	1N	8,643	110,766		53	PHE	HE*	2C		
40	GLY	HA1	1C	4,095			53	PHE	HZ	1C		
40	GLY	HA2	1C	3,796			54	PRO	HA	1C	4,173	
41	GLU	HN	1N	7,902	120,944		54	PRO	HB1	1C		
41	GLU	HA	1C	4,692			54	PRO	HB2	1C		

54	PRO	HG*	2C			67	GLN	HE22	2N		
54	PRO	HD1	1C			68	GLU	HN	1N	7,764	119,571
54	PRO	HD2	1C			68	GLU	HA	1C	4,058	
55	GLU	HN	1N	8,772	126,433	68	GLU	HB*	2C	2,190	
55	GLU	HA	1C	3,880		68	GLU	HG*	2C	2,416	
55	GLU	HB1	1C	2,196		69	ILE	HN	1N	7,987	120,145
55	GLU	HB2	1C	2,035		69	ILE	HA	1C	3,711	
55	GLU	HG*	2C	2,436		69	ILE	HB	1C	1,764	
56	GLU	HN	1N	9,213	117,816	69	ILE	HG*	2C	1,068	
56	GLU	HA	1C	4,058		69	ILE	HG2*	3C	0,893	
56	GLU	HB1	1C	2,196		69	ILE	HD1*	3C	0,893	
56	GLU	HB2	1C	1,767		70	LEU	HN	1N	8,627	118,887
56	GLU	HG*	2C	2,480		70	LEU	HA	1C	3,872	
57	LEU	HN	1N	7,156	111,872	70	LEU	HB*	2C	1,730	
57	LEU	HA	1C	4,029		70	LEU	HG	1C	1,730	
57	LEU	HB*	2C	1,233		70	LEU	HD1*	3C	0,913	
57	LEU	HG	1C	0,857		70	LEU	HD2*	3C	0,913	
57	LEU	HD1*	3C	0,233		71	GLN	HN	1N	8,084	117,867
57	LEU	HD2*	3C	-0,020		71	GLN	HA	1C	3,980	
58	LYS	HN	1N	7,478	119,805	71	GLN	HB*	2C	2,196	
58	LYS	HA	1C	4,204		71	GLN	HG*	2C	2,428	
58	LYS	HB*	2C	2,123		71	GLN	HE21	2N		
58	LYS	HG*	2C	1,602		71	GLN	HE22	2N		
58	LYS	HD*	2C	1,929		72	ARG	HN	1N	7,586	118,908
58	LYS	HE*	2C	-100,000		72	ARG	HA	1C	4,129	
59	PRO	HA	1C			72	ARG	HB*	2C	2,167	
59	PRO	HB1	1C	2,588		72	ARG	HG*	2C	1,856	
59	PRO	HB2	1C			72	ARG	HD*	2C		
59	PRO	HG*	2C	2,267		73	LEU	HN	1N	8,287	118,468
59	PRO	HD1	1C	3,798		73	LEU	HA	1C	3,981	
59	PRO	HD2	1C	3,530		73	LEU	HB1	1C	1,857	
60	LEU	HN	1N	7,970	115,025	73	LEU	HB2	1C	1,262	
60	LEU	HA	1C	3,977		73	LEU	HG	1C	2,046	
60	LEU	HB1	1C	1,770		73	LEU	HD1*	3C	0,738	
60	LEU	HB2	1C	1,362		73	LEU	HD2*	3C	0,588	
60	LEU	HG	1C	2,044		74	GLU	HN	1N	8,697	118,260
60	LEU	HD1*	3C	0,681		74	GLU	HA	1C	3,744	
60	LEU	HD2*	3C	0,681		74	GLU	HB*	2C	2,213	
61	CYS	HN	1N	7,916	115,289	74	GLU	HG*	2C	2,558	
61	CYS	HA	1C	3,955		75	GLU	HN	1N	7,613	118,272
61	CYS	HB1	1C	3,315		75	GLU	HA	1C	4,009	
61	CYS	HB2	1C	2,897		75	GLU	HB*	2C	2,210	
62	LYS	HN	1N	7,150	115,265	75	GLU	HG1	1C	2,662	
62	LYS	HA	1C	4,446		75	GLU	HG2	1C	2,429	
62	LYS	HB1	1C	2,019		76	ILE	HN	1N		
62	LYS	HB2	1C	1,866		76	ILE	HA	1C		
62	LYS	HG*	2C	1,457		76	ILE	HB	1C		
62	LYS	HD*	2C	1,684		76	ILE	HG*	2C		
62	LYS	HE*	2C	-100,000		76	ILE	HG2*	3C		
63	GLU	HN	1N	7,646	120,217	76	ILE	HD1*	3C		
63	GLU	HA	1C	4,609		77	ALA	HN	1N	8,175	120,325
63	GLU	HB*	2C	2,045		77	ALA	HA	1C	3,755	
63	GLU	HG1	1C	2,542		77	ALA	HB*	3C	1,439	
63	GLU	HG2	1C	2,378		78	GLU	HN	1N	7,579	113,349
64	PRO	HA	1C	4,426		78	GLU	HA	1C	4,112	
64	PRO	HB*	2C	2,100		78	GLU	HB*	2C	2,046	
64	PRO	HG*	2C			78	GLU	HG*	2C	2,510	
64	PRO	HD*	2C	3,993		79	ASP	HN	1N	7,523	117,919
65	ASN	HN	1N	8,469	114,469	79	ASP	HA	1C	4,925	
65	ASN	HA	1C	5,123		79	ASP	HB1	1C	2,913	
65	ASN	HB1	1C	3,125		79	ASP	HB2	1C	2,688	
65	ASN	HB2	1C	2,828		80	PRO	HA	1C		
65	ASN	HD21	2N			80	PRO	HB*	2C		
65	ASN	HD22	2N			80	PRO	HG1	1C		
66	ALA	HN	1N	7,427	121,846	80	PRO	HG2	1C		
66	ALA	HA	1C	3,840		80	PRO	HD1	1C		
66	ALA	HB*	3C	1,599		80	PRO	HD2	1C		
67	GLN	HN	1N	8,920	114,585	81	GLY	HN	1N	8,561	108,869
67	GLN	HA	1C	3,915		81	GLY	HA*	2C	3,957	
67	GLN	HB*	2C	2,056		82	THR	HN	1N	8,063	113,723
67	GLN	HG*	2C	2,409		82	THR	HA	1C	4,229	
67	GLN	HE21	2N			82	THR	HB	1C	4,229	

82	THR	HG*	3C	1,219	
83	CYS	HN	1N	7,849	115,904
83	CYS	HA	1C	4,540	
83	CYS	HB1	1C	3,157	
83	CYS	HB2	1C	2,893	
84	GLU	HN	1N		
84	GLU	HA	1C		
84	GLU	HB1	1C		
84	GLU	HB2	1C		
84	GLU	HG*	2C		
85	ILE	HN	1N		
85	ILE	HA	1C		
85	ILE	HB	1C		
85	ILE	HG*	2C		
85	ILE	HG2*	3C		
85	ILE	HD1*	3C		
86	SER	HN	1N	8,130	116,963
86	SER	HA	1C	4,343	
86	SER	HB*	2C	3,976	
87	ALA	HN	1N		
87	ALA	HA	1C		
87	ALA	HB*	3C		
88	TYR	HN	1N		
88	TYR	HA	1C		
88	TYR	HB*	2C		
88	TYR	HD*	2C		
88	TYR	HE*	2C		
89	ALA	HN	1N		
89	ALA	HA	1C		
89	ALA	HB*	3C		
90	ALA	HN	1N		
90	ALA	HA	1C	4,436	
90	ALA	HB*	3C	1,461	
91	CYS	HN	1N	8,340	117,378
91	CYS	HA	1C	5,073	
91	CYS	HB*	2C	3,266	
92	THR	HN	1N	8,435	114,817
92	THR	HA	1C	4,535	
92	THR	HB	1C	4,242	
92	THR	HG*	3C	1,187	
93	GLY	HN	1N	8,522	111,471
93	GLY	HA*	2C	4,065	
94	SER	HN	1N	7,973	120,976
94	SER	HA	1C	4,327	
94	SER	HB*	2C	3,857	

11.5 Experimentelle Randbedingungen für die Berechnung der Proguanylin-Struktur

Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind die aus den NOE-Daten erhaltenen Distanzbeschränkungen nicht wiedergegeben, können jedoch unter dem PDB Eintrag 1o8r abgefragt werden.

11.5.1 $^3J(\text{HN}, \text{H}\alpha)$ -Kopplungskonstanten

```

assign (resid 2 and name C ) (resid 3 and name N )
      (resid 3 and name CA ) (resid 3 and name C ) 10 -120 40 2 !
J( 3) = 9.71
assign (resid 3 and name C ) (resid 4 and name N )
      (resid 4 and name CA ) (resid 4 and name C ) 10 -120 40 2 !
J( 4) = 8.58
assign (resid 6 and name C ) (resid 7 and name N )
      (resid 7 and name CA ) (resid 7 and name C ) 10 -120 40 2 !
J( 7) = 8.30
assign (resid 9 and name C ) (resid 10 and name N )
      (resid 10 and name CA ) (resid 10 and name C ) 10 -120 40 2 !
J(10) = 9.40
assign (resid 10 and name C ) (resid 11 and name N )
      (resid 11 and name CA ) (resid 11 and name C ) 10 -60 20 2 !
J(11) = 3.76
assign (resid 14 and name C ) (resid 15 and name N )
      (resid 15 and name CA ) (resid 15 and name C ) 10 -60 20 2 !
J(15) = 4.48
assign (resid 15 and name C ) (resid 16 and name N )
      (resid 16 and name CA ) (resid 16 and name C ) 10 -60 20 2 !
J(16) = 3.61
assign (resid 16 and name C ) (resid 17 and name N )
      (resid 17 and name CA ) (resid 17 and name C ) 10 -60 20 2 !
J(17) = 5.41
assign (resid 49 and name C ) (resid 50 and name N )
      (resid 50 and name CA ) (resid 50 and name C ) 10 -60 20 2 !
J(50) = 5.27
assign (resid 52 and name C ) (resid 53 and name N )
      (resid 53 and name CA ) (resid 53 and name C ) 10 -60 20 2 !
J(53) = 3.48
assign (resid 54 and name C ) (resid 55 and name N )
      (resid 55 and name CA ) (resid 55 and name C ) 10 -60 20 2 !
J(55) = 1.88
assign (resid 55 and name C ) (resid 56 and name N )
      (resid 56 and name CA ) (resid 56 and name C ) 10 -60 20 2 !
J(56) = 3.34
assign (resid 56 and name C ) (resid 57 and name N )
      (resid 57 and name CA ) (resid 57 and name C ) 10 -120 40 2 !
J(57) = 8.11
assign (resid 57 and name C ) (resid 58 and name N )
      (resid 58 and name CA ) (resid 58 and name C ) 10 -60 20 2 !
J(58) = 2.79
assign (resid 64 and name C ) (resid 65 and name N )
      (resid 65 and name CA ) (resid 65 and name C ) 10 -120 40 2 !
J(65) = 9.65
assign (resid 70 and name C ) (resid 71 and name N )
      (resid 71 and name CA ) (resid 71 and name C ) 10 -60 20 2 !
J(71) = 4.13
assign (resid 73 and name C ) (resid 74 and name N )
      (resid 74 and name CA ) (resid 74 and name C ) 10 -60 20 2 !
J(74) = 3.86
assign (resid 84 and name C ) (resid 85 and name N )
      (resid 85 and name CA ) (resid 85 and name C ) 10 -120 40 2 !
J(85) = 10.99
assign (resid 87 and name C ) (resid 88 and name N )

```

```

      (resid 88 and name CA ) (resid 88 and name C ) 10 -120 40 2 !
J( 88) = 8.30
assign (resid 90 and name C ) (resid 91 and name N )
      (resid 91 and name CA ) (resid 91 and name C ) 10 -120 40 2 !
J( 91) = 9.5
assign (resid 8 and name C ) (resid 9 and name N )
      (resid 9 and name CA ) (resid 9 and name C ) 10 -120 40 2 !
J( 9) = 10.5
assign (resid 66 and name C ) (resid 67 and name N )
      (resid 67 and name CA ) (resid 67 and name C ) 10 -60 20 2 !
J( 67) = 4.8
assign (resid 91 and name C ) (resid 92 and name N )
      (resid 92 and name CA ) (resid 92 and name C ) 10 -120 40 2 !
J( 92) = 10.7
assign (resid 1 and name C ) (resid 2 and name N )
      (resid 2 and name CA ) (resid 2 and name C ) 10 -120 40 2 !
J( 2) = 11.5
assign (resid 7 and name C ) (resid 8 and name N )
      (resid 8 and name CA ) (resid 8 and name C ) 10 -120 40 2 !
J( 8) = 9.3
assign (resid 67 and name C ) (resid 68 and name N )
      (resid 68 and name CA ) (resid 68 and name C ) 10 -60 20 2 !
J( 68) = 5.6
assign (resid 74 and name C ) (resid 75 and name N )
      (resid 75 and name CA ) (resid 75 and name C ) 10 -60 20 2 !
J( 75) = 5.6
assign (resid 61 and name C ) (resid 62 and name N )
      (resid 62 and name CA ) (resid 62 and name C ) 10 -120 40 2 !
J( 62) = 9.3
assign (resid 51 and name C ) (resid 52 and name N )
      (resid 52 and name CA ) (resid 52 and name C ) 10 -120 40 2 !
J( 52) = 9.0
assign (resid 35 and name C ) (resid 36 and name N )
      (resid 36 and name CA ) (resid 36 and name C ) 10 -60 20 2 !
J( 36) = 5.5

```

11.5.2 Beschränkungen durch Wasserstoffbrücken

```

assign (resid 79 and name hn ) (resid 76 and name o) 0.0 0.0 2.3
assign (resid 79 and name n ) (resid 76 and name o) 0.0 0.0 3.1

assign (resid 78 and name hn ) (resid 74 and name o) 0.0 0.0 2.3
assign (resid 78 and name n ) (resid 74 and name o) 0.0 0.0 3.1

assign (resid 77 and name hn ) (resid 73 and name o) 0.0 0.0 2.3
assign (resid 77 and name n ) (resid 73 and name o) 0.0 0.0 3.1

assign (resid 76 and name hn ) (resid 72 and name o) 0.0 0.0 2.3
assign (resid 76 and name n ) (resid 72 and name o) 0.0 0.0 3.1

assign (resid 75 and name hn ) (resid 71 and name o) 0.0 0.0 2.3
assign (resid 75 and name n ) (resid 71 and name o) 0.0 0.0 3.1

assign (resid 74 and name hn ) (resid 70 and name o) 0.0 0.0 2.3
assign (resid 74 and name n ) (resid 70 and name o) 0.0 0.0 3.1

assign (resid 73 and name hn ) (resid 69 and name o) 0.0 0.0 2.3
assign (resid 73 and name n ) (resid 69 and name o) 0.0 0.0 3.1

assign (resid 70 and name hn ) (resid 66 and name o) 0.0 0.0 2.3
assign (resid 70 and name n ) (resid 66 and name o) 0.0 0.0 3.1

assign (resid 69 and name hn ) (resid 65 and name o) 0.0 0.0 2.3
assign (resid 69 and name n ) (resid 65 and name o) 0.0 0.0 3.1

assign (resid 16 and name hn ) (resid 12 and name o) 0.0 0.0 2.3
assign (resid 16 and name n ) (resid 12 and name o) 0.0 0.0 3.1

assign (resid 17 and name hn ) (resid 13 and name o) 0.0 0.0 2.3
assign (resid 17 and name n ) (resid 13 and name o) 0.0 0.0 3.1

```

```

assign (resid 18 and name hn ) (resid 14 and name o) 0.0 0.0 2.3
assign (resid 18 and name n ) (resid 14 and name o) 0.0 0.0 3.1

assign (resid 3 and name hn ) (resid 10 and name o) 0.0 0.0 2.3
assign (resid 3 and name n ) (resid 10 and name o) 0.0 0.0 3.1

assign (resid 10 and name hn ) (resid 3 and name o) 0.0 0.0 2.3
assign (resid 10 and name n ) (resid 3 and name o) 0.0 0.0 3.1

assign (resid 57 and name hn ) (resid 54 and name o) 0.0 0.0 2.3
assign (resid 57 and name n ) (resid 54 and name o) 0.0 0.0 3.1

assign (resid 58 and name hn ) (resid 55 and name o) 0.0 0.0 2.3
assign (resid 58 and name n ) (resid 55 and name o) 0.0 0.0 3.1

assign (resid 60 and name hn ) (resid 57 and name o) 0.0 0.0 2.3
assign (resid 60 and name n ) (resid 57 and name o) 0.0 0.0 3.1

assign (resid 63 and name hn ) (resid 60 and name o) 0.0 0.0 2.3
assign (resid 63 and name n ) (resid 60 and name o) 0.0 0.0 3.1

assign (resid 4 and name hn ) (resid 90 and name o) 0.0 0.0 2.3
assign (resid 4 and name n ) (resid 90 and name o) 0.0 0.0 3.1

assign (resid 53 and name hn ) (resid 50 and name o) 0.0 0.0 2.3
assign (resid 53 and name n ) (resid 50 and name o) 0.0 0.0 3.1

!assign (resid 84 and name hn ) (resid 81 and name o) 0.0 0.0 2.3
!assign (resid 84 and name n ) (resid 81 and name o) 0.0 0.0 3.1

assign (resid 85 and name hn ) (resid 82 and name o) 0.0 0.0 2.3
assign (resid 85 and name n ) (resid 82 and name o) 0.0 0.0 3.1

assign (resid 86 and name hn ) (resid 83 and name o) 0.0 0.0 2.3
assign (resid 86 and name n ) (resid 83 and name o) 0.0 0.0 3.1

assign (resid 92 and name hn ) (resid 2 and name o) 0.0 0.0 2.3
assign (resid 92 and name n ) (resid 2 and name o) 0.0 0.0 3.1

assign (resid 61 and name hn ) (resid 57 and name o) 0.0 0.0 2.3
assign (resid 61 and name n ) (resid 57 and name o) 0.0 0.0 3.1

```

11.5.3 Beschränkungen durch residuale dipolare Kopplungen

```

assign ( resid 500 and name OO )
      ( resid 500 and name Z )
      ( resid 500 and name Y )
      ( resid 500 and name X )
      ( resid 1 and name N )
      ( resid 1 and name HN )      -0.33  0.5000

assign ( resid 500 and name OO )
      ( resid 500 and name Z )
      ( resid 500 and name Y )
      ( resid 500 and name X )
      ( resid 2 and name N )
      ( resid 2 and name HN )      -1.67  0.5000

assign ( resid 500 and name OO )
      ( resid 500 and name Z )
      ( resid 500 and name Y )
      ( resid 500 and name X )
      ( resid 3 and name N )
      ( resid 3 and name HN )      2.49  0.5000

assign ( resid 500 and name OO )
      ( resid 500 and name Z )
      ( resid 500 and name Y )
      ( resid 500 and name X )

```

	(resid 4 and name N)		
	(resid 4 and name HN)	-2.76	0.5000
assign	(resid 500 and name OO)		
	(resid 500 and name Z)		
	(resid 500 and name Y)		
	(resid 500 and name X)		
	(resid 5 and name N)		
	(resid 5 and name HN)	6.02	0.5000
assign	(resid 500 and name OO)		
	(resid 500 and name Z)		
	(resid 500 and name Y)		
	(resid 500 and name X)		
	(resid 6 and name N)		
	(resid 6 and name HN)	1.58	0.5000
assign	(resid 500 and name OO)		
	(resid 500 and name Z)		
	(resid 500 and name Y)		
	(resid 500 and name X)		
	(resid 7 and name N)		
	(resid 7 and name HN)	-7.48	0.5000
assign	(resid 500 and name OO)		
	(resid 500 and name Z)		
	(resid 500 and name Y)		
	(resid 500 and name X)		
	(resid 8 and name N)		
	(resid 8 and name HN)	7.17	0.5000
assign	(resid 500 and name OO)		
	(resid 500 and name Z)		
	(resid 500 and name Y)		
	(resid 500 and name X)		
	(resid 10 and name N)		
	(resid 10 and name HN)	6.08	0.5000
assign	(resid 500 and name OO)		
	(resid 500 and name Z)		
	(resid 500 and name Y)		
	(resid 500 and name X)		
	(resid 11 and name N)		
	(resid 11 and name HN)	1.21	0.5000
assign	(resid 500 and name OO)		
	(resid 500 and name Z)		
	(resid 500 and name Y)		
	(resid 500 and name X)		
	(resid 12 and name N)		
	(resid 12 and name HN)	-4.01	0.5000
assign	(resid 500 and name OO)		
	(resid 500 and name Z)		
	(resid 500 and name Y)		
	(resid 500 and name X)		
	(resid 13 and name N)		
	(resid 13 and name HN)	-0.79	0.5000
assign	(resid 500 and name OO)		
	(resid 500 and name Z)		
	(resid 500 and name Y)		
	(resid 500 and name X)		
	(resid 14 and name N)		
	(resid 14 and name HN)	-0.24	0.5000
assign	(resid 500 and name OO)		
	(resid 500 and name Z)		
	(resid 500 and name Y)		
	(resid 500 and name X)		
	(resid 15 and name N)		
	(resid 15 and name HN)	-4.71	0.5000

```

assign ( resid 500 and name OO )
      ( resid 500 and name Z )
      ( resid 500 and name Y )
      ( resid 500 and name X )
      ( resid 16 and name N )
      ( resid 16 and name HN )      -2.31  0.5000

assign ( resid 500 and name OO )
      ( resid 500 and name Z )
      ( resid 500 and name Y )
      ( resid 500 and name X )
      ( resid 17 and name N )
      ( resid 17 and name HN )      -0.39  0.5000

assign ( resid 500 and name OO )
      ( resid 500 and name Z )
      ( resid 500 and name Y )
      ( resid 500 and name X )
      ( resid 18 and name N )
      ( resid 18 and name HN )      -0.82  0.5000

assign ( resid 500 and name OO )
      ( resid 500 and name Z )
      ( resid 500 and name Y )
      ( resid 500 and name X )
      ( resid 48 and name N )
      ( resid 48 and name HN )      6.08  0.5000

assign ( resid 500 and name OO )
      ( resid 500 and name Z )
      ( resid 500 and name Y )
      ( resid 500 and name X )
      ( resid 50 and name N )
      ( resid 50 and name HN )      2.91  0.5000

assign ( resid 500 and name OO )
      ( resid 500 and name Z )
      ( resid 500 and name Y )
      ( resid 500 and name X )
      ( resid 52 and name N )
      ( resid 52 and name HN )      3.92  0.5000

assign ( resid 500 and name OO )
      ( resid 500 and name Z )
      ( resid 500 and name Y )
      ( resid 500 and name X )
      ( resid 53 and name N )
      ( resid 53 and name HN )      -8.14  0.5000

assign ( resid 500 and name OO )
      ( resid 500 and name Z )
      ( resid 500 and name Y )
      ( resid 500 and name X )
      ( resid 55 and name N )
      ( resid 55 and name HN )      4.65  0.5000

assign ( resid 500 and name OO )
      ( resid 500 and name Z )
      ( resid 500 and name Y )
      ( resid 500 and name X )
      ( resid 56 and name N )
      ( resid 56 and name HN )      -1.94  0.5000

assign ( resid 500 and name OO )
      ( resid 500 and name Z )
      ( resid 500 and name Y )
      ( resid 500 and name X )
      ( resid 57 and name N )
      ( resid 57 and name HN )      1.91  0.5000

assign ( resid 500 and name OO )

```

```

( resid 500 and name Z )
( resid 500 and name Y )
( resid 500 and name X )
( resid 58 and name N )
( resid 58 and name HN )      5.59  0.5000

assign ( resid 500 and name OO )
( resid 500 and name Z )
( resid 500 and name Y )
( resid 500 and name X )
( resid 60 and name N )
( resid 60 and name HN )      0.24  0.5000

assign ( resid 500 and name OO )
( resid 500 and name Z )
( resid 500 and name Y )
( resid 500 and name X )
( resid 61 and name N )
( resid 61 and name HN )      6.84  0.5000

assign ( resid 500 and name OO )
( resid 500 and name Z )
( resid 500 and name Y )
( resid 500 and name X )
( resid 62 and name N )
( resid 62 and name HN )     -3.31  0.5000

assign ( resid 500 and name OO )
( resid 500 and name Z )
( resid 500 and name Y )
( resid 500 and name X )
( resid 63 and name N )
( resid 63 and name HN )     -2.98  0.5000

assign ( resid 500 and name OO )
( resid 500 and name Z )
( resid 500 and name Y )
( resid 500 and name X )
( resid 65 and name N )
( resid 65 and name HN )      0.73  0.5000

assign ( resid 500 and name OO )
( resid 500 and name Z )
( resid 500 and name Y )
( resid 500 and name X )
( resid 66 and name N )
( resid 66 and name HN )     -6.02  0.5000

assign ( resid 500 and name OO )
( resid 500 and name Z )
( resid 500 and name Y )
( resid 500 and name X )
( resid 67 and name N )
( resid 67 and name HN )     -5.90  0.5000

assign ( resid 500 and name OO )
( resid 500 and name Z )
( resid 500 and name Y )
( resid 500 and name X )
( resid 68 and name N )
( resid 68 and name HN )     -4.28  0.5000

assign ( resid 500 and name OO )
( resid 500 and name Z )
( resid 500 and name Y )
( resid 500 and name X )
( resid 69 and name N )
( resid 69 and name HN )     -7.90  0.5000

assign ( resid 500 and name OO )
( resid 500 and name Z )
( resid 500 and name Y )

```

```

( resid 500 and name X )
( resid 70 and name N )
( resid 70 and name HN ) -7.60 0.5000

assign ( resid 500 and name OO )
( resid 500 and name Z )
( resid 500 and name Y )
( resid 500 and name X )
( resid 71 and name N )
( resid 71 and name HN ) -4.40 0.5000

assign ( resid 500 and name OO )
( resid 500 and name Z )
( resid 500 and name Y )
( resid 500 and name X )
( resid 72 and name N )
( resid 72 and name HN ) -4.92 0.5000

assign ( resid 500 and name OO )
( resid 500 and name Z )
( resid 500 and name Y )
( resid 500 and name X )
( resid 74 and name N )
( resid 74 and name HN ) -5.77 0.5000

assign ( resid 500 and name OO )
( resid 500 and name Z )
( resid 500 and name Y )
( resid 500 and name X )
( resid 75 and name N )
( resid 75 and name HN ) -2.70 0.5000

assign ( resid 500 and name OO )
( resid 500 and name Z )
( resid 500 and name Y )
( resid 500 and name X )
( resid 76 and name N )
( resid 76 and name HN ) -5.93 0.5000

assign ( resid 500 and name OO )
( resid 500 and name Z )
( resid 500 and name Y )
( resid 500 and name X )
( resid 77 and name N )
( resid 77 and name HN ) -4.98 0.5000

assign ( resid 500 and name OO )
( resid 500 and name Z )
( resid 500 and name Y )
( resid 500 and name X )
( resid 78 and name N )
( resid 78 and name HN ) 2.12 0.5000

assign ( resid 500 and name OO )
( resid 500 and name Z )
( resid 500 and name Y )
( resid 500 and name X )
( resid 79 and name N )
( resid 79 and name HN ) -2.22 0.5000

assign ( resid 500 and name OO )
( resid 500 and name Z )
( resid 500 and name Y )
( resid 500 and name X )
( resid 81 and name N )
( resid 81 and name HN ) -5.04 0.5000

assign ( resid 500 and name OO )
( resid 500 and name Z )
( resid 500 and name Y )
( resid 500 and name X )
( resid 82 and name N )

```

	(resid 82 and name HN)	-2.37	0.5000
assign	(resid 500 and name OO)		
	(resid 500 and name Z)		
	(resid 500 and name Y)		
	(resid 500 and name X)		
	(resid 83 and name N)		
	(resid 83 and name HN)	-1.33	0.5000
assign	(resid 500 and name OO)		
	(resid 500 and name Z)		
	(resid 500 and name Y)		
	(resid 500 and name X)		
	(resid 84 and name N)		
	(resid 84 and name HN)	-0.30	0.5000
assign	(resid 500 and name OO)		
	(resid 500 and name Z)		
	(resid 500 and name Y)		
	(resid 500 and name X)		
	(resid 85 and name N)		
	(resid 85 and name HN)	2.34	0.5000
assign	(resid 500 and name OO)		
	(resid 500 and name Z)		
	(resid 500 and name Y)		
	(resid 500 and name X)		
	(resid 86 and name N)		
	(resid 86 and name HN)	-1.85	0.5000
assign	(resid 500 and name OO)		
	(resid 500 and name Z)		
	(resid 500 and name Y)		
	(resid 500 and name X)		
	(resid 88 and name N)		
	(resid 88 and name HN)	8.69	0.5000
assign	(resid 500 and name OO)		
	(resid 500 and name Z)		
	(resid 500 and name Y)		
	(resid 500 and name X)		
	(resid 89 and name N)		
	(resid 89 and name HN)	9.70	0.5000
assign	(resid 500 and name OO)		
	(resid 500 and name Z)		
	(resid 500 and name Y)		
	(resid 500 and name X)		
	(resid 90 and name N)		
	(resid 90 and name HN)	1.91	0.5000
assign	(resid 500 and name OO)		
	(resid 500 and name Z)		
	(resid 500 and name Y)		
	(resid 500 and name X)		
	(resid 92 and name N)		
	(resid 92 and name HN)	-2.64	0.5000
assign	(resid 500 and name OO)		
	(resid 500 and name Z)		
	(resid 500 and name Y)		
	(resid 500 and name X)		
	(resid 93 and name N)		
	(resid 93 and name HN)	1.70	0.5000
assign	(resid 500 and name OO)		
	(resid 500 and name Z)		
	(resid 500 and name Y)		
	(resid 500 and name X)		
	(resid 94 and name N)		
	(resid 94 and name HN)	1.06	0.5000

12. Danksagung

Diese Arbeit wurde im Zeitraum von September 2000 bis Juli 2003 am Lehrstuhl für Struktur und Chemie der Biopolymere der Universität Bayreuth unter Leitung von PD Dr. Ute C. Marx angefertigt. Ihr danke ich für die Überlassung des interessanten Themas, zahlreiche Diskussionen und Denkanstöße.

Prof. Dr. Paul Rösch danke ich für die hervorragenden Arbeitsbedingungen und für die Möglichkeit der Nutzung der gesamten Infrastruktur des Lehrstuhls.

Dr. Amanda Nourse (Institute for Molecular Bioscience, Brisbane, Australien) danke ich für die Einführung in die analytische Ultrazentrifugation und die herzliche Aufnahme in ihrer Familie während meines Aufenthaltes in Brisbane.

Prof. Dr. Heinrich Sticht (Universität Erlangen) danke ich für zahlreiche Diskussionen und die Bereitstellung der XPLOR-Protokolle für die Verfeinerung der Strukturen mit residualen dipolaren Kopplungen.

IPF PharmaCeuticals (Hannover) danke ich für die Bereitstellung der Plasmide pGEM-T-EK-*proguanylin* und pGEM-T-Xa-*proguanylin* und Dr. Axel Schulz für die Durchführung spezieller Analysemethoden, die am Lehrstuhl nicht verfügbar sind.

Prof. Dr. Yuji Hidaka (Universität Osaka, Japan) danke ich für die Bereitstellung der cDNA der GC-C_{ECD}.

Allen Mitarbeitern des Lehrstuhls danke ich für die stetige Hilfsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre. Für die nette Unterstützung im Labor danke ich Nadine Herz und Ulrike Herzing. Philipp Neudecker möchte ich insbesondere für die Aufnahme der Tripelresonanzexperimente danken, Ulrich Scheckenhofer danke ich für die Aufnahme von ESI-Massenspektren.

13. Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Ferner erkläre ich, daß ich noch nicht anderweitig mit oder ohne Erfolg versucht habe, eine Dissertation einzureichen oder mich der Doktorprüfung zu unterziehen.

Bayreuth, den